
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA DE MATERIALES

Puntos cuánticos como nanotermómetros luminiscentes: hipertermia plasmónica controlada.

Memoria presentada por:
Laura Martínez Maestro
para optar al grado de:
Doctor en Ciencias Físicas

Directores de Tesis:
Prof. José García Solé
Prof. Daniel Jaque García

Madrid, 5 de febrero de 2015

Quantum dots as luminescent nanothermometers: controlled plasmonic hyperthermia.

Thesis report presented by:
Laura Martínez Maestro
To obtain the degree of:
Doctor en Ciencias Físicas

Thesis supervisors:
Prof. José García Solé
Prof. Daniel Jaque García

Madrid, 5th February 2015

“Si vas a emprender el viaje hacia Ítaca
pide que tu camino sea largo,
rico en experiencia, en conocimiento.
A Lestrigones y a Cíclopes,
o al airado Poseidón nunca temas,
no hallarás tales seres en tu ruta
si alto es tu pensamiento y limpia
la emoción de tu espíritu y tu cuerpo.
A Lestrigones ni a Cíclopes,
ni al fiero Poseidón hallarás nunca,
si no los llevas dentro de tu alma,
si no es tu alma quien ante ti los pone.
Pide que tu camino sea largo.
Que numerosas sean las mañanas de verano
en que con placer, felizmente
arribes a bahías nunca vistas;
detente en los emporios de Fenicia
y adquiere hermosas mercancías,
madreperlas y coral, y ámbar y ébano,
perfúmenes deliciosos y diversos,
cuanto puedas invierte en voluptuosos y delicados perfumes;
visita muchas ciudades de Egipto
y con avidez aprende de sus sabios.
Ten siempre a Ítaca en la memoria.
Llegar allí es tu meta.
Mas no apresures el viaje.
Mejor que se extienda largos años;
y en tu vejez arribes a la isla
con cuanto hayas ganado en el camino,
sin esperar que Ítaca te enriquezca.
Ítaca te regaló un hermoso viaje.
Sin ella el camino no hubieras emprendido.
Mas ninguna otra cosa puede darte.
Aunque pobre la encuentres, no te engañará Ítaca.
Rico en saber y vida, como has vuelto,
comprendes ya qué significan las Ítacas.”

(Constantino Kavafis)

Agradecimientos

Al empezar una aventura nunca sabes cómo te va a ir. Ni siquiera qué vas a encontrar en tu camino. Yo empecé sin saber muy bien cómo en el mundo de la ciencia y no podía imaginar cuánto me iba a gustar. Tanto, que he terminado esta tesis doctoral. Sin embargo, no soy yo la única culpable de este éxito, ¡ni mucho menos! Por eso quisiera empezar agradeciendo a las personas que me han ayudado a llegar hasta aquí.

Antes que a nadie más, quisiera darles las gracias a mis dos directores de tesis, que me han ayudado y apoyado. Al profesor José García Solé (Pepe) por su infinita paciencia conmigo a la hora de escribir, por animarme cuando yo pensaba que no podía con esto, por siempre estar disponible para discutir la infinidad de dudas que me asaltaban y por hacer que con él me sienta “como en casa”.

Al profesor Daniel Jaque García (Dani), la persona más implicada con el trabajo, por enseñarme todo lo que sé experimentalmente, por estar disponible siempre, y para lo que sea, ya sea profesionalmente como personalmente, y porque es la única persona capaz de tenerte trabajando un sábado por la noche y que estés contento por ello.

Durante la realización de mi tesis, mis directores han creado un grupo de investigación, el FIG, al que he visto nacer y crecer y a cuyos miembros tengo mucho que agradecer también.

A la doctora Emma Martín Rodríguez, quien me sufrió en mis primeros tiempos en el laboratorio, cuando ella estaba escribiendo la tesis, y a la que no debí dejar escribir ni una frase seguida; me enseñó, me sigue enseñando, y las dos sabemos que seguirá enseñándome, un montón de cosas, de la ciencia, de la burocracia, de la vida y es un gran ejemplo a seguir.

A la doctora Patricia Haro González (Patri), con quien tantos buenos ratos he pasado midiendo juntas en el laboratorio, en tres o cuatro montajes distintos ¡a la vez! , quien todo sabe sobre origin. También compañera de viaje (¡foto-palo!), de prácticas y de despacho.

A Blanca del Rosal, compañera de fatigas, confidente de quejas en el laboratorio, de viajes, de gimnasio y, sobre todo, amiga. Quien me ha

acompañado en mis viajes alrededor del mundo, ya sea en persona o virtualmente. Sin ella todo sería mucho menos divertido.

Al resto de miembros del grupo, que han tenido menos implicación en esta tesis doctoral, ya sea por haber llegado después o por trabajar en ámbitos más alejados, les tengo también mucho que agradecer:

A la profesora María del Carmen Iglesias de la Cruz (Mamen) y al profesor Francisco Sanz (Paco), quienes componen la parte biológica del grupo, por estar siempre dispuestos a explicar las dudas, muchas veces absurdas o triviales, que hemos tenido sobre lo que les ocurría a las células.

Al doctor Dirk Ortgies, nuestro químico de cabecera, por la gran paciencia que demuestra cuando le pedimos ayuda para entender los “misterios de la química”. Me parece extraordinario que no le hayamos provocado un infarto todavía con las barbaridades químicas que somos capaces de decir.

A Paloma Rodríguez Sevilla, la pequeña del grupo, que se ha integrado a la perfección con todos nosotros.

También han pasado por el grupo un montón de visitantes, algunos de los cuales incluso han llegado a formar parte de él, como es el caso del doctor Uéslen Rocha, a quien conocí en mi primera estancia en Brasil y con quien no me puedo enfadar, ¡porque él no se deja! y también como es el caso de Irene Villa, siempre tan divertida. Otros visitantes sólo compartieron unos pocos meses con nosotros, pero siempre tendré un gran recuerdo suyo. Wagner, Ningning, Juan, Mónica, Adrian y Teresita, gracias por acercarme vuestras culturas, ¡sin moverme de casa!

No quiero olvidarme de los antiguos miembros del grupo, el doctor Antonio Benayas, con quien siempre discreparé por todo, reconciliándonos siempre; el doctor Airán Ródenas, que me ayudó en mi estancia escocesa y la doctora Elizabeth Navarro a quien mi familia casi adopta.

Por el grupo han pasado además estudiantes de grado y de máster a los que les quiero agradecer una visión fresca de lo que aquí estábamos haciendo. En especial quisiera mencionar a Esther Calle, mi primera alumna y a Ana Rodríguez,

mi segunda, por forzarme a profundizar en las bases de nuestros experimentos, sin olvidarme de Alberto, Héctor y de Vicent, que nos puso a correr a todos.

Durante los años que he estado haciendo esta tesis me he ido de estancia a los más diversos rincones del planeta, lo cual ha ampliado mis horizontes y me ha enseñado cómo se trabaja en otros sitios. Me gustaría agradecer al profesor Carlos Jacinto la gran acogida que tuve en su laboratorio en la Universidade Federal de Alagoas en Maceió, Brasil. De mi estancia en la Heriott-Watt University en Edimburgo, me gustaría agradecer a la profesora Lynn Patterson y al profesor Ajoy Kar, que me permitieran conocer su grupo de investigación; al profesor Min Gu me gustaría agradecerle su invitación a conocer la Swinburne University en Melbourne y su gran confianza en que sería capaz de obtener resultados. De estas estancias no sólo obtuve resultados científicos, también conocí a varias personas a las que quería mencionar aquí: al grupo de españoles de Edimburgo, en especial a Diego Álvarez, que me hace de hermano mayor; a Pati compañera de turístiqueos por Australia y Priya en quien encontré una amiga en el último confín del mundo (I found a friend in her in the world's edge)

Fuera del grupo también hay personas que me han ayudado. En especial quiero expresar mi gratitud hacia el doctor **Luis Mateos**, quien empezó siendo compañero de máster y se convirtió en gran amigo; Jon, mitad de mi dúo humorístico y la doctora Marta Quintanilla, mi pareja de piscina. Gracias a ellos venir a la universidad día tras día era mucho más agradable porque, aparte de trabajar, venía a divertirme.

Entre los profesores del departamento me gustaría mencionar a Carmen Aragón, Mercedes Carrascosa, Ángel García, Fernando Cussó, Manuel Marqués y David Bravo, por siempre tener una palabra de apoyo e interesarse por la marcha de mi tesis. Mención especial merece Francisco Jaque, quién no sólo se acordaba de mí por los pasillos, sino que venía a preguntarme a mi mesa y Ginés Lifante, el mejor profesor que he tenido, y quien es el culpable, aunque él no lo sepa, de que yo me interesara por el mundo de la investigación. Sin Elías Rodríguez y su soporte técnico e informático esta tesis no existiría, ¡muchas gracias por hacer que no perdiera todos los datos del disco duro!

A mis amigos, tanto los que encontré en la carrera (Carlos; Héctor; Elena Castellano, compañera de danza entre otras muchas cosas; Roberto, mi primer

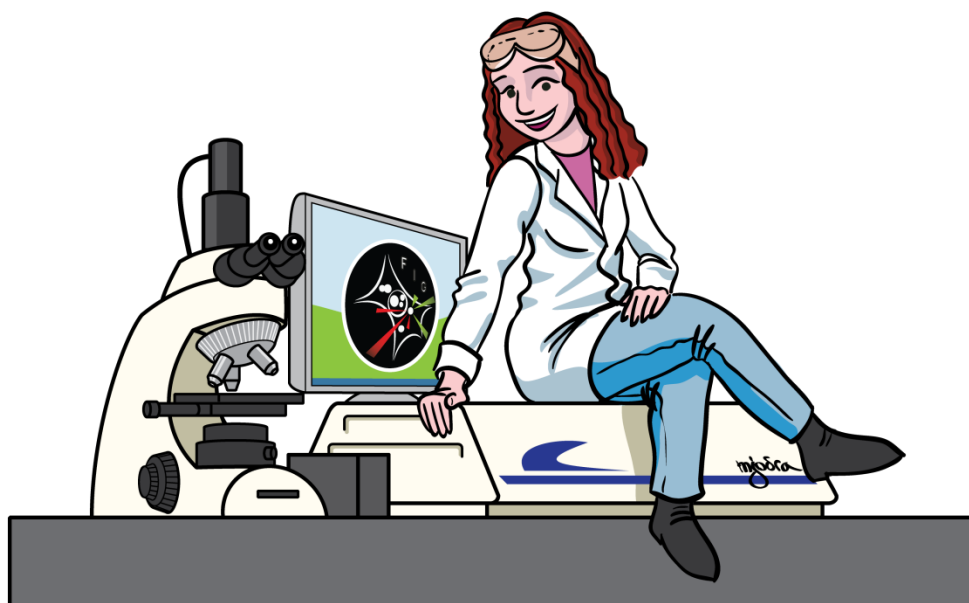
lector; Alicia, quien me dijo antes que nadie que la ciencia era mi vocación; Andrea, que me conoce casi más que yo misma, y sus secuaces, Nacho y Dani), como a los conguenses (Cris, Mamen, Noe, Tere y Loz) y a los que no puedo etiquetar en un grupo (Iris, Ana Guti; Ana Orive; Elena Manjavacas; David, que me ha puesto en forma; Lore; siempre tan positiva y Sandra, mi periodista favorita) a quien en distintos grados he dado la tabarra con la tesis, no sólo en la parte final de la escritura, también durante las estancias o cuando algo no salía. Siempre han creído que llegaría hasta aquí y me dejaban hablar durante horas con palabras que ni entendían ni les interesaban, pero siempre intentando ayudarme, o al menos haciendo como que me escuchaban.

También quiero agradecer a mi familia, Luci, Pepe, Conchi, Marta, Pablo, Juan Pablo, Ángel, Paula y Juan Antonio, que me ha animado y han creído en mí desde el principio. Con especial mención a mis tías MariTere y Henar, por el gran apoyo, no sólo emocional, sino también logístico, de tías madrinas con el que me han obsequiado durante mis años en Madrid. A mis abuelos Elo y Sebe les tengo que agradecer que sean los mejores abuelos del mundo, que estén tan orgullosos de mí y siempre pendientes de mis andanzas por el laboratorio. A mi hermano, con quien tanto discuto, pero sin quien no podría vivir, que compartimos el amor por la ciencia y que es alguien de quien puedo presumir.

A Miguel, quien me apoya a diario, me anima si me veo superada por los acontecimientos e intenta bajarme de la nube cuando creo que soy “la próxima ganadora de un Nobel”, quien todavía no ha renunciado a que sea racional y quien todavía se enfada cuando me pongo a trabajar en fin de semana. Gracias por aguantarme tantos años, que a veces sé que es difícil.

He dejado para el final a mis padres, a quienes indudablemente más tengo que agradecer. Siempre me animaron a estudiar, a esforzarme para conseguir mis metas, jamás me negaron nada y son un gran ejemplo a seguir, aunque a veces parezca que yo intento seguir el ejemplo contrario. Sin su apoyo nunca habría podido llegar hasta aquí.

A todos vosotros, muchas gracias.



Resumen

En la presente tesis doctoral se estudian puntos cuánticos de semiconductor como nanotermómetros, así como su aplicación en nanomedicina. Estas nanopartículas, como ya se mencionó anteriormente, han sido utilizadas ampliamente en la realización de bioimágenes.(Chan and Nie 1998, Michalet et al. 2005) Además, varios de los parámetros de su luminiscencia son sensibles a la temperatura en el rango fisiológico de temperaturas. Otra de sus características interesantes es su tamaño nanométrico, el cual permite una fácil incorporación en células. Asimismo, gracias a la intensa investigación en este campo en los últimos años, se han desarrollado tanto distintos tamaños como composiciones de estas nanopartículas, lo cual es altamente interesante para estudios comparativos. Cabe destacar que varios tipos de estas nanopartículas se encuentran de forma comercial. Para nuestro estudio hemos elegido puntos cuánticos de CdTe, ya que era posible disponer de una gran variedad de tamaños para realizar un estudio comparativo de sus propiedades. El otro material elegido para este estudio fue el CdSe, debido a que se trata de uno de los materiales constituyentes de puntos cuánticos de semiconductor más utilizado en aplicaciones biomédicas.(Alivisatos et al. 2005)

En una segunda parte, se han probado los puntos cuánticos de semiconductor de CdSe como termómetros en células vivas sometidas a procesos de calentamiento celular por agentes externos. Seguidamente, en aras de conseguir un proceso de calentamiento celular controlado y más eficiente que el anteriormente utilizado, se estudia la eficiencia de calentamiento de distintas nanopartículas de oro. Estas nanopartículas, capaces de generar calor al ser iluminadas con luz, han sido ya utilizadas como agentes fototérmicos;(Jaque Garcia et al. 2014) Sin embargo, no existía un estudio comparativo de la dependencia geométrica de la eficiencia de calentamiento, como el que se realiza en esta tesis doctoral, en la que también se estudia la dependencia de la eficiencia de calentamiento de nano bastoncillos de oro con la longitud de onda de su plasmón de resonancia en la primera y en la segunda ventanas biológicas. Posteriormente, se estudiará la eficiencia de calentamiento de otro tipo de estructuras metálicas, los nanotubos de carbono, a diferentes longitudes de onda.

Este tipo de nanoestructuras presentan tanto un coeficiente de absorción como una eficiencia de calentamiento prácticamente independientes de la longitud de onda. Tras ello, se comprobará la existencia de una longitud de onda óptima para conseguir una mayor selectividad y penetración en tejidos animales en terapias fototérmicas.

Por último, se aplicarán tanto los nanotermómetros semiconductores de CdSe como los nano bastoncillos de oro en terapia fototérmica de células de cáncer de cuello de útero utilizando fuentes láser con longitudes de onda dentro de la primera ventana biológica.

Summary

In this thesis work, semiconductor quantum dots are studied as nanothermometers for application in nanomedicine. These nanoparticles, as was discussed before, have been widely used in bioimaging (Chan and Nie 1998, Michalet et al. 2005). In addition, some of their luminescent properties are sensitive to temperature changes in the physiological temperature range. Another of their compelling features is their nanometric size, which allows for their intracellular incorporation. Besides, thanks to the intense research in this field in the past years, different sizes and compositions of these nanoparticles have been developed, which is really interesting for comparative studies. It is important to notice that some kinds of these nanoparticles are commercially available. For our study, we have chosen CdTe semiconductor quantum dots due to their great diversity of sizes, so that a comparative study of their properties could be performed. The other chosen material was CdSe, as it is the most widely used material in biomedical applications. (Alivisatos et al. 2005)

In the second part of this thesis, CdSe quantum dots have been tested as intracellular nanothermometers during external heating processes. At that point, in order to accomplish a controlled and more efficient heating process, the heating efficiency of different gold nanoparticles is studied. These nanoparticles, capable of heat generation under illumination with light, have been extensively used as photothermal agents; (Jaques Garcia et al. 2014). Nevertheless, there was a lack of studies regarding the geometry dependence of the heating efficiency of different gold nanoparticles as the one carried out in this thesis. The dependence of the heating efficiency of gold nanorods with their plasmon resonance wavelength dependence in the first and second biological window is also studied. After that, the heating efficiency of another metallic structure, carbon nanotubes, is studied at different wavelengths. This kind of nanostructures presents a wavelength-independent absorption coefficient and also a wavelength-independent heating efficiency. Thereafter, the existence of an optimum wavelength to maximize selectivity and animal tissue penetration in photothermal therapies will be investigated.

Finally, CdSe quantum dots nanothermometers and gold nanorods nanoheaters will be applied to photothermal therapy of cervical cancer cells using laser light at a wavelength lying in the first biological window.

Contenido/Content

Agradecimientos	4
Resumen.....	9
Summary	11
1.Introducción.....	15
Introducción	16
2.Puntos cuánticos de semiconductores.....	25
Introducción	26
2.1.Confinamiento cuántico.....	28
2.2.Dependencia de la luminiscencia de QDs con la temperatura.....	37
2.2.1.Cambios en la posición espectral de la emisión debidos a la temperatura. 37	
2.2.2.La importancia de la superficie.....	41
2.2.3.Disminución de la intensidad de la luminiscencia con la temperatura... 43	
2.2.4.Variación del decaimiento temporal de la luminiscencia con la temperatura.	46
3.Nanopartículas metálicas.....	47
Introducción.....	48
3.1.Propiedades ópticas de nanopartículas metálicas.....	51
3.2.Mecanismos de calentamiento de nanopartículas metálicas.....	60
3.3.Nanoestructuras de carbono.....	66
4. Técnicas experimentales.....	71
Introducción.....	72
4.1.Nanopartículas.....	73
4.1.1.Puntos cuánticos de semiconductor.....	73
4.1.1.1.Puntos cuánticos de semiconductor con estructura núcleo-corteza .	
.....	73
4.1.1.2.Puntos cuánticos de semiconductor de estructura de núcleo sencillo.	75
4.1.2.Nanopartículas de oro	78
4.1.2.1.Nanobastoncillos de oro (GNRs)	79
4.1.2.1.1.Nanobastoncillos de oro suministrados por la casa Nanopartz.	
.....	80
4.1.2.1.2.Nanobastoncillos de oro suministrados por la casa Nanorods. .	
.....	81
4.1.2.2.Nanocáscaras de oro (GNSs)	82
4.1.2.3.Nanodados de oro (GNCs).....	83
4.1.2.4.Nanoestrellas de oro (GNSts).....	84
4.1.2.4.1.Nanoestrellas de oro de lóbulos cortos (GNSts-s).....	84
4.1.2.4.2.Nanoestrellas de oro de lóbulos largos (GNSts-l).....	85
4.1.3.Nanotubos de carbono.....	86

4.2.Caracterización óptica de las Nanopartículas	87
4.2.1.Espectroscopia básica.	87
4.2.1.1.Extinción.....	87
4.2.1.2.Emisión.....	87
4.2.2.Eficiencia cuántica. El método de la lente térmica.....	89
4.2.3.Método experimental para determinar la eficiencia de calentamiento.	94
4.3.Imágenes por fluorescencia.	100
4.3.1.Microscopio confocal de fluorescencia.	100
4.3.2.Microscopio multifotónico.	101
4.3.3.Imagen térmica.....	102
4.4.Experimentos de terapia fototérmica <i>in vivo</i>	104
5.Nanotermómetros.....	105
Introducción	106
5.1.Tamaño óptimo para imagen fluorescente.....	108
5.2.Sensibilidad térmica de la fluorescencia.....	117
5.3.Influencia del tamaño en la sensibilidad térmica.	124
5.4.Termoimagen fluorescente	128
5.5.Termometría celular.....	131
5.6.Nanotermómetros para imagen <i>in vivo</i>	137
Conclusiones.....	143
6.Nanocalentadores.	145
Introducción	146
6.1.Nanocalentadores basados en nanopartículas de oro.	149
6.1.1.Eficiencia de calentamiento. Influencia de la geometría de las nanopartículas.	149
6.1.2.Eficiencia de los GNRs en las ventanas biológicas.	157
6.2.Nanocalentadores basados en nanotubos de carbono.	164
Conclusiones.....	174
7.Fototerapia controlada.....	177
Introducción	178
7.1.Incorporación de las nanopartículas a las células.....	180
7.2.Experimentos de fototerapia controlada.....	185
7.3.Difusión del calor.....	190
Conclusiones.....	192
8.Conclusiones/ Conclusions	193
8.1.Conclusiones.....	194
1.1.Conclusions.....	196
Referencias	201

1. Introducción

Introducción

Los avances de los últimos años en la integración de nanoestructuras coloidales en biología y medicina han creado un gran impacto en la comunidad científica. La **Figura 1** muestra como el número de publicaciones por año que investigan sobre el uso de nanopartículas en aplicaciones biomédicas (bioimagen) ha crecido exponencialmente en el último cuarto de siglo. Una de las razones de esta tendencia es el rápido desarrollo en la síntesis, manipulación y caracterización de la forma, tamaño y composición de las nanopartículas, hecho que también ha sufrido un desarrollo exponencial, como puede verse también en la **Figura 1**. En esta figura también se muestra el número de publicaciones por año relacionadas con la investigación sobre puntos cuánticos de semiconductor y nanopartículas de oro, nanopartículas que se utilizan frecuentemente en estudios biomédicos. Otra de las razones es el desarrollo de la química superficial de nanopartículas, de tal manera que la integración de éstas en sistemas biológicos es posible. (Klostranec and Chan 2006) Las nanopartículas han sido utilizadas en distintos campos integrados en aplicaciones biológicas, ya sea como biosensores, marcado de células, imagen animal y terapia. Este nuevo campo de investigación híbrido entre la biología y la ciencia de nanomateriales se ha denominado nanomedicina. (Klostranec and Chan 2006) Otra de las razones del avance en la bioimagen ha sido el desarrollo de los láseres de femtosegundos, cuya popularidad, como se puede ver también en la **Figura 1**, ha sufrido un aumento en las últimas décadas y, gracias a los cuales, ha sido posible la generación de imágenes vía excitación multifotónica.

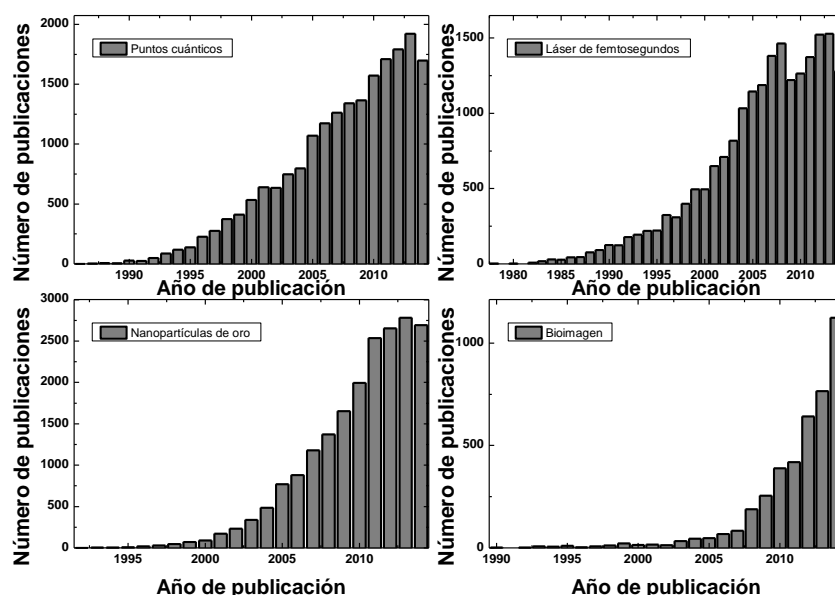


Figura 1. Número de publicaciones por año en diferentes temas relacionados con la presente tesis doctoral, los puntos cuánticos, las nanopartículas de oro, los láseres de femtosegundos y la bioimagen.

La temperatura es una variable termodinámica fundamental cuya medición es crucial.(Childs et al. 2000) De hecho existe un gran número de investigaciones sobre la medición de la temperatura cuyo número se incrementa cada año.(Scifinder 2015) Sin embargo, las aproximaciones tradicionales a la medición de la temperatura no son aptas para la medida de la temperatura por debajo de $10\mu\text{m}$.(Brites et al. 2013) No obstante, áreas tales como microelectrónica, microfluídica, fotónica y nanomedicina demandan la medición precisa de la temperatura a escala submicrométrica. La obtención de la distribución de temperaturas intracelulares de forma precisa es un reto todavía sin solución para la comunidad científica ya que, como se ha mencionado anteriormente, las técnicas convencionales, tales como la termografía o las basadas en la detección mediante termopares, tienen una baja resolución espacial con lo que no son válidas a nivel celular. Una gran alternativa a estas técnicas es la microscopía de fluorescencia, la cual tiene la ventaja de ser una técnica sin contacto en la que se puede aprovechar la sensibilidad a la temperatura de distintas características fluorescentes de fluoróforos en el rango fisiológico de temperaturas ($30\text{-}50^{\circ}\text{C}$).

Los colorantes orgánicos fueron los primeros materiales utilizados como termómetros fluorescentes y agentes de imagen, simultáneamente, en células vivas.(Chapman et al. 1995) Sin embargo, los colorantes orgánicos se degradan fácilmente cuándo son excitados con luz ultravioleta y visible (Song et al. 1995) por lo que es interesante buscar otros materiales resistentes a la degradación por exposición a la luz. Entre estos nuevos materiales cabe destacar los puntos cuánticos de semiconductor.

Los puntos cuánticos de semiconductor son unos de los agentes fluorescentes más utilizados para conseguir bioimágenes,(Chan and Nie 1998, Michalet et al. 2005) ya que, sus métodos de síntesis están muy avanzados, posibilitando, mediante la variación del tamaño, la obtención del espectro de emisión deseado para una aplicación particular. La superficie de estas nanopartículas puede ser recubierta de forma específica, de tal manera que sean dispersables en agua o en otros tipos de solventes, y que también esté específicamente dirigida a un grupo de células en particular. Además, gracias al recubrimiento, se puede reducir la toxicidad, llegando a tener altos grados de biocompatibilidad.(Derfus et al. 2004)

Por otra parte, otro de los retos de la nanotecnología es proponer nuevas técnicas para calentar tumores de manera localizada y remota, basadas en la incorporación de nanopartículas calentadoras. Hoy en día las más conocidas y populares son aquellas en las cuales el calentamiento está originado mediante la aplicación de campos magnéticos oscilantes (radiofrecuencia). El procedimiento de las terapias térmicas que utilizan nanopartículas magnéticas, tales como las de óxido de hierro, es simple, se incorporan las nanopartículas al organismo para que se acumulen en el tumor a tratar y se aplica un campo magnético oscilante que provoca el calentamiento. Sin embargo, existen otros tipos de terapias térmicas, como la terapia fototérmica, la cual utiliza luz para generar calor en las nanopartículas. Históricamente la terapia fototérmica no se ha considerado una buena opción debido a la absorción de la luz por parte de los tejidos.(Jaque Garcia et al. 2014) Sin embargo, existen regiones del espectro electromagnético en los que la absorción de la luz por los tejidos se minimiza. Estas regiones son las denominadas “ventanas biológicas”. Las Ventanas Biológicas (BW, por sus siglas en inglés), son los rangos espectrales en los que los tejidos presentan una transparencia parcial debido a la reducción tanto de la absorción como del

esparcimiento de la luz.(Konig 2000) La **Figura 2** presenta el espectro de extinción (debido tanto a la absorción como al esparcimiento de la luz) de un tejido humano epitelial típico. En una aproximación a primer orden, la extinción de la radiación óptica en los tejidos está determinada por la presencia de bandas de absorción de los constituyentes, tales como el agua o la hemoglobina, mientras que el esparcimiento de la luz supone un fondo que crece según decrece la longitud de onda.(Jaques Garcia et al. 2014) La presencia de varias bandas de absorción define dos ventanas biológicas (también mostradas en la **Figura 2**):

- La primera ventana biológica (I-BW) se extiende desde los 700 hasta los 950 nm y corresponde al espacio espectral definido entre la absorción en el visible de la hemoglobina y la banda de absorción característica del agua a 980 nm. En esta región espectral la absorción de la luz prácticamente se desvanece pero la extinción sigue existiendo debido a la presencia de esparcimiento de la luz residual.(Jaques et al. 2014)
- La segunda ventana biológica (II-BW) se extiende desde los 1000 hasta los 1350 nm, estos límites impuestos por otras absorciones específicas del agua. En esta región espectral la absorción óptica no se desvanece por completo pero el esparcimiento de la luz se minimiza.(Smith et al. 2009)

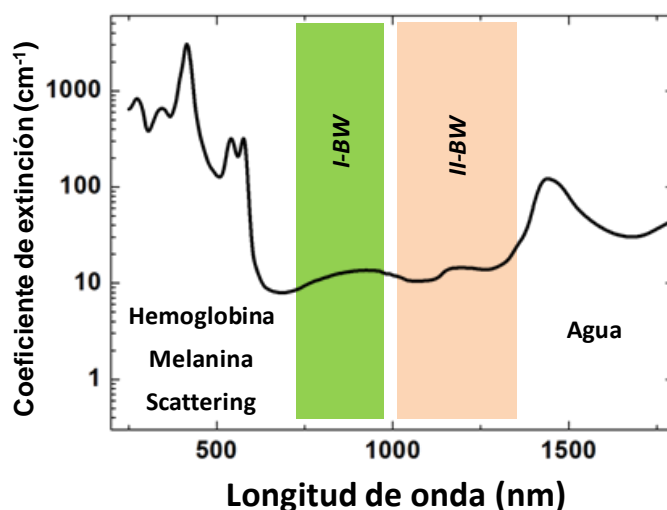


Figura 2. Coeficiente de extinción de un tejido representativo. Los diferentes efectos que llevan a la atenuación de la luz (tales como la presencia de hemoglobina, agua o esparcimiento, scattering, de la luz) están indicadas. La extensión espectral de las ventanas biológicas (I-BW para la primera y II-BW para la segunda) también está indicada.

A pesar de los buenos resultados obtenidos con las nanopartículas magnéticas, la nanotecnología está explorando otras alternativas. Entre ellas, las nanopartículas que generan calor tras ser excitadas con luz están cobrando una gran relevancia, sobre todo una vez que las limitaciones impuestas por la absorción en los tejidos se puedan superar. De los diferentes tipos de nanopartículas de este género que existen actualmente cabe destacar las metálicas, debido a su alta eficiencia de calentamiento, sus avanzados métodos de síntesis y a su posibilidad de trabajar dentro de las ventanas biológicas.

Debido a que la temperatura a la que se encuentra un sistema biológico es un parámetro clave que afecta drásticamente a la estructura de moléculas fundamentales para la supervivencia celular, como son las proteínas, las cuales pueden sufrir procesos de desnaturalización al aumentar la temperatura de su entorno tan solo unos pocos grados centígrados. La medida de la temperatura con una alta resolución es, por tanto, muy importante en las terapias de hipertermia, de tal manera que el calentamiento se produzca de forma controlada para proteger al tejido sano que rodea al tejido en el que se está aplicando la terapia.

En la presente tesis doctoral se estudian puntos cuánticos de semiconductor como nanotermómetros así como su aplicación en nanomedicina. Estas nanopartículas, como ya se mencionó anteriormente, han sido utilizadas ampliamente en la realización de bioimágenes. (Chan and Nie 1998, Michalet et al. 2005) Además, varios de los parámetros de su luminiscencia son sensibles a la temperatura en el rango fisiológico de temperaturas. Otra de sus características interesantes es su tamaño nanométrico, el cual permite una fácil incorporación en células. Asimismo, gracias a la intensa investigación en este campo en los últimos años, se han desarrollado tanto distintos tamaños como composiciones de estas nanopartículas, lo cual es altamente interesante para estudios comparativos. Cabe destacar que varios tipos de estas nanopartículas se encuentran de forma comercial. Para nuestro estudio hemos elegido puntos cuánticos de CdTe, ya que era posible disponer de una gran variedad de tamaños para realizar un estudio comparativo de sus propiedades. El otro material elegido para este estudio fue el CdSe, debido a que se trata de uno de los materiales constituyentes de puntos cuánticos de semiconductor más utilizado en aplicaciones biomédicas. (Alivisatos et al. 2005)

En una segunda parte, se han probado los puntos cuánticos de semiconductor de CdSe como termómetros en células vivas sometidas a procesos de calentamiento celular por agentes externos. Seguidamente, en aras de conseguir un proceso de calentamiento celular controlado y más eficiente que el anteriormente utilizado, se estudia la eficiencia de calentamiento de distintas nanopartículas de oro. Estas nanopartículas, capaces de generar calor al ser iluminadas con luz, han sido ya utilizadas como agentes fototérmicos; (Jaques Garcia et al. 2014) sin embargo, no existía un estudio comparativo de la dependencia geométrica de la eficiencia de calentamiento, como el que se realiza en esta tesis doctoral, en la que también se estudia la dependencia de la eficiencia de calentamiento de nano bastoncillos de oro con la longitud de onda de su plasmón de resonancia en la primera y en la segunda ventana biológicas. Posteriormente, se estudiará la eficiencia de calentamiento de otro tipo de estructuras metálicas, los nanotubos de carbono, a diferentes longitudes de onda. Este tipo de nanoestructuras presentan tanto un coeficiente de absorción como una eficiencia de calentamiento prácticamente independientes de la longitud de onda. Tras ello se comprobará la existencia de una longitud de onda óptima para

conseguir una mayor selectividad y penetración en tejidos animales en terapias fototérmicas.

Por último, se aplicarán tanto los nanotermómetros semiconductores de CdSe como los nano bastoncillos de oro en terapia fototérmica de células de cáncer de cuello de útero utilizando fuentes láser con longitudes de onda dentro de la primera ventana biológica.

La memoria se ha estructurado en ocho capítulos, cuyo contenido se resume a continuación:

Capítulo 2: Puntos cuánticos de semiconductor:

Este capítulo está dedicado a la descripción de las propiedades de los puntos cuánticos de semiconductor, prestando especial atención al confinamiento cuántico y a la dependencia de las propiedades luminiscentes de estas nanopartículas con la temperatura.

Capítulo 3: Nanopartículas metálicas:

En este capítulo se describen las propiedades ópticas básicas de las nanopartículas metálicas para su utilización como nanocalentadores. En la primera parte del capítulo se detallan las propiedades ópticas de las nanopartículas de oro así como los mecanismos de calentamiento de éstas, mientras que la segunda parte del capítulo está dedicado a las nanoestructuras de carbono.

Capítulo 4: Técnicas experimentales:

En este capítulo se describen las técnicas experimentales utilizadas en la presente tesis doctoral para la caracterización óptica de las nanopartículas, la determinación de la eficiencia de calentamiento y los experimentos de fototermia.

Capítulo 5: Nanotermómetros:

Este capítulo se centra en la descripción y discusión de los resultados experimentales sobre los puntos cuánticos de semiconductor estudiados, de CdTe

y de CdSe: tamaño óptimo para imagen fluorescente, sensibilidad térmica de la fluorescencia, influencia del tamaño en la sensibilidad térmica, termografía fluorescente, termografía celular y termografía para imagen *in vivo*.

Capítulo 6: Nanocalentadores:

En la primera parte de este capítulo se estudia la influencia de la geometría de nanopartículas de oro en su eficiencia de calentamiento, después se estudia la geometría más conveniente para una mayor eficiencia en las dos ventanas biológicas. Por último se han estudiado las nanopartículas de carbono como nanocalentadores a fin de determinar la longitud de onda óptima para terapia fototérmica.

Capítulo 7: Fototermica controlada:

En este capítulo se presentan los resultados encontrados en los experimentos de fototermia controlada utilizando nano bastoncillos de oro como nanocalentadores y puntos cuánticos de CdSe como nanotermómetros en células de cáncer de cuello de útero.

Capítulo 8: Conclusiones:

En este capítulo se resumen los principales resultados obtenidos.

2. Puntos cuánticos de semiconductores.

Introducción

Los sensores fluorescentes están siendo ampliamente utilizados en biología celular. Sin embargo, los fluoróforos orgánicos, que son los sensores más utilizados, sufren un rápido fotoblanqueo, lo que ha llevado a la investigación de otros materiales más estables a la irradiación por luz. Por ello, el avance en síntesis y biofuncionalización de nanocristales de semiconductor a partir de la década de 1980 ha generado e incrementado su uso e interés en el área de la biología y la medicina. Estas partículas cristalinas de tamaños nanométricos, también llamadas puntos cuánticos de semiconductor (QDs por sus iniciales en inglés), están compuestas de materiales de los grupos II-VI (como el caso de los de CdSe) o III-V (como es el caso de los InP) de la tabla periódica.

La investigación en QDs comenzó tras el descubrimiento de que las propiedades ópticas y eléctricas de partículas pequeñas de semiconductor dependen fuertemente del tamaño de la partícula debido al confinamiento cuántico.

En 1998 dos grupos, uno liderado por Alivisatos y otro por Nie, demostraron simultáneamente que los QD podían sintetizarse para que fueran dispersables en agua, con lo que sus aplicaciones biológicas se incrementaron.

Generalmente el color de un cristal no depende de su tamaño o forma. Así, el típico color rosáceo del rubí, el primer láser de estado sólido, está dado por el diagrama de niveles de energía de los iones de Cr^{3+} que actúan como dopantes de la matriz de Al_2O_3 y que son independientes del tamaño y forma del cristal.(Imbusch 1989) Sin embargo, las propiedades de cristales de semiconductor, que presentan su absorción en el visible o en el infrarrojo cercano, se ven fuertemente modificadas cuando se confinan a tamaño nanométrico, de tal forma que el color de la emisión se convierte en dependiente del tamaño. Por ejemplo, los cristales macroscópicos de CdSe tienen un típico color gris, debido a la energía de su banda prohibida se encuentra en 1.44 eV (861 nm); sin embargo, cuando estos cristales se sintetizan dando lugar a esferas con diámetro nanométrico los colores de estos varían dependiendo del tamaño de su diámetro.(Norris and Bawendi 1996)

Como ejemplo podemos ver en la **Figura 3** como cambia el color de soluciones que contienen QDs de CdSe (CdSe-QDs a partir de ahora) de distinto tamaño. Se puede observar como el color de las soluciones cambia gradualmente del verde al marrón según el tamaño del QD aumenta. Este cambio del color de la nanopartícula con el tamaño conlleva la posibilidad de aplicar estas nanopartículas a diferentes campos, tales como las aplicaciones en láser, dispositivos con pantalla, células solares altamente eficientes o imagen fluorescente con alto brillo y resolución. (Alivisatos et al. 2005, Arya et al. 2005, Bera et al. 2010)

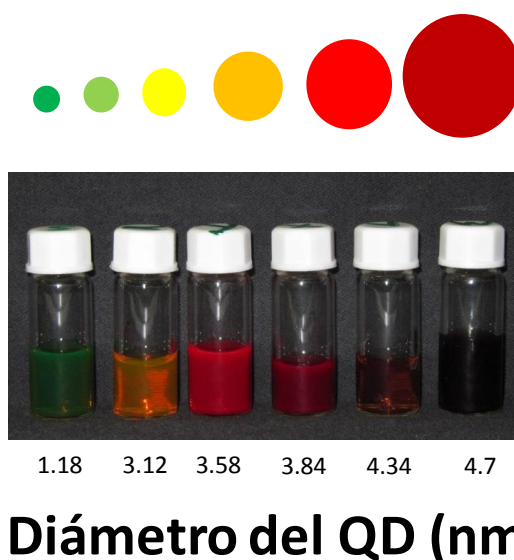


Figura 3. Imágenes digitales de las soluciones acuosas que contienen CdSe-QDs de distintos diámetros.

Como veremos en este capítulo, las propiedades fluorescentes de los QDs (pico de emisión, intensidad de emisión y vida media de emisión) se verán afectadas por los cambios de temperatura, por lo que estas nanopartículas podrían ser utilizadas como nanotermómetros. En este capítulo también se estudiará cómo cambian las propiedades luminiscentes con el tamaño de los QDs. La última parte del capítulo describirá como la respuesta de las propiedades ópticas y térmicas de los QDs son extremadamente dependientes de su superficie y del entorno en el que se encuentren.

2.1. Confinamiento cuántico.

Cuando un cristal semiconductor es excitado con fotones de energías iguales o mayores que la energía de la banda prohibida (gap, en inglés), los electrones (y los huecos) excitados pueden moverse libremente en el cristal. Es también bien conocido que cuando partículas libres (electrones o huecos) se confinan espacialmente, por ejemplo en una caja, sus estados de energía se restringen, llevando a niveles de energía discretos dependientes del tamaño. Como regla general, la separación entre estos niveles de energía crece con el grado de confinamiento. Para sistemas suficientemente pequeños (como los nanocristales) estos efectos de confinamiento cuántico empiezan a manifestarse debido a la fuerte dependencia de las propiedades fluorescentes con el tamaño. En el material en volumen, los electrones (y huecos) excitados del semiconductor pueden moverse como partículas libres con su longitud de onda asociada

característica, la llamada longitud de onda de de Broglie, $\lambda_B = \frac{h}{p_x}$ (siendo h la

constante de Plank y p_x el momento lineal en la dirección de confinamiento, x). En un material cuántico, el grosor de un material semiconductor en volumen se reduce por debajo de la longitud de onda de de Broglie correspondiente al movimiento térmico de los electrones. (Fox 2001) Estas estructuras de confinamiento unidimensional (1D) normalmente se denotan como pozos cuánticos (QWs, Quantum Wells en inglés). Se puede estimar cuánto debe ser el espesor de un QW en un cristal semiconductor para poder observar efectos de confinamiento cuántico tan solo considerando que la energía térmica de un electrón asociada con un grado de movimiento unidimensional, $\frac{kT}{2}$ (siendo k la

constante de Boltzman y T la temperatura), es igual la energía cinética del electrón $\frac{p_x^2}{2m_e^*}$ (siendo m_e^* la masa efectiva del electrón). Teniendo en cuenta que

los efectos de confinamiento se manifestarán a partir de un espesor similar a λ_B ,

$x \approx \frac{h}{p_x}$, esta condición puede expresarse como:

$$\frac{\left(\frac{h}{x}\right)^2}{2m_e^*} \approx \frac{kT}{2} \quad (1)$$

Que tras despejar el espesor:

$$x \approx \sqrt{\frac{h^2}{m_e^* kT}} \quad (2)$$

Para el caso del CdSe, $m_e^* = 0.13m_e$ (con m_e la masa del electrón) (Dickerson 2005) podemos ver que el espesor necesario para observar efectos de confinamiento cuántico es del orden de 30 nm. En el caso del CdTe, el otro semiconductor a estudio en esta tesis, como $m_e^* = 0.11m_e$ (Marple 1963) el espesor necesario para conseguir confinamiento cuántico también será del orden de 30 nm.

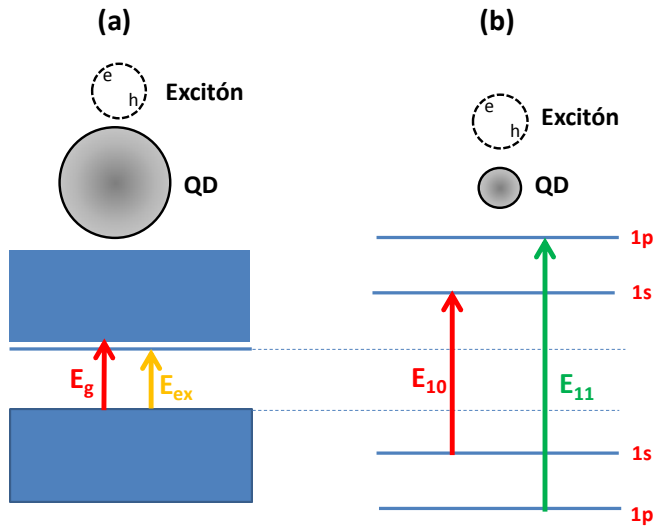


Figura 4. Diagrama esquemático de los niveles de energía pertenecientes a un QD grande (a) o pequeño (b) definido respecto al tamaño del excitón.

Esta estimación burda indica la importancia de confinar a escala nanométrica para conseguir ver la dependencia con el tamaño causado por el confinamiento cuántico. Los QWs son estructuras unidimensionales, pero este confinamiento cuántico de los portadores de carga se puede extender a dos dimensiones (las estructuras conocidas como hilos cuánticos) o a tres dimensiones

(QDs). Los QDs son estructuras esféricas nanométricas que corresponden al confinamiento tridimensional de los portadores de carga. Para entender las propiedades espectroscópicas asociadas a un QD primero tenemos que pensar en las transiciones ópticas que se producen en el material semiconductor en volumen cuando se excita con fotones de energía cercana a la de la banda prohibida, E_g .

Excitar justo por debajo de la energía de la banda prohibida lleva a la formación de pares electrón-hueco (ver **Figura 4 (a)**). Estos pares de electrón-hueco, pueden moverse juntos en el semiconductor y son conocidos por el nombre de excitones. El tamaño de los excitones viene dado por el llamado radio de Bohr del excitón (conocido por a_B^e), dado por $a_B^e = \varepsilon_r \left(\frac{m_e}{\mu} \right) a_B$, donde μ es la

masa efectiva del excitón ($\mu = \frac{m_e^* + m_h^*}{m_e^* \cdot m_h^*}$, con m_e^* y m_h^* las masas reducidas del

electrón y el hueco respectivamente), ε_r la constante dieléctrica del material y a_B es el radio de Bohr. En este punto podemos decir que los efectos de confinamiento cuántico se podrán observar en QDs cuando el tamaño del QD sea igual o menor que el tamaño del excitón en el material en volumen (ver **Figura 4(b)**). Para los CdSe-QDs (como $\varepsilon_r = 10.1$, $m_e^* = 0.13m_e$ and $m_h^* = 0.45m_e$), se puede estimar un radio de Bohr del excitón de $a_B^e \approx 5.3nm$.

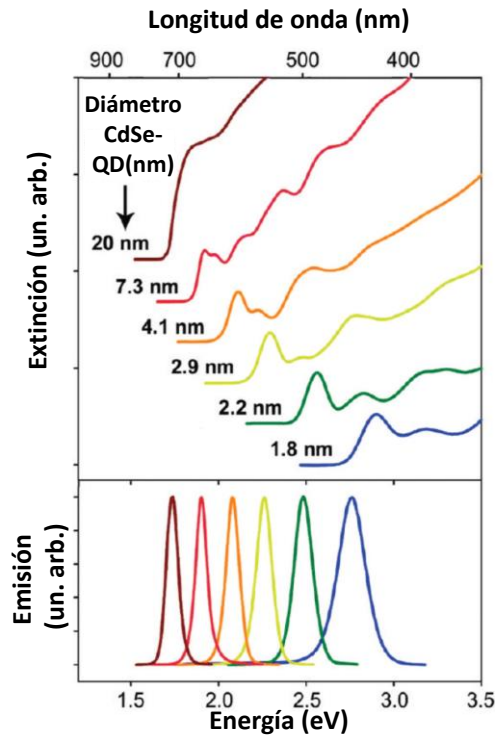


Figura 5. (a) Espectros de extinción normalizados y (b) espectros de emisión normalizados de CdSe-QDs de distintos diámetros a temperatura ambiente. (Smith et al. 2006)

Por tanto, los efectos de confinamiento cuántico empezarán a notarse a partir de diámetros menores de 10 nm, este hecho puede verse corroborado en la **Figura 5 (a)**, en la cual se pueden ver los espectros de extinción de CdSe-QDs de distintos diámetros. Para partículas de 20 nm de diámetro (correspondientes a un radio de 10 nm) el espectro de extinción es básicamente el del material de volumen, sin poder observarse efectos de confinamiento cuántico. Sin embargo, para QDs menores de 10 nm, se observa un desplazamiento hacia el azul en la posición del pico de extinción conforme disminuye el tamaño del QD. En particular, puede verse como para QDs de diámetros menores a 5 nm, se pueden resolver una serie de picos individuales. Estos picos corresponden a diferentes transiciones de los QDs (ver **Figura 5 (b)**). Típicamente, el pico de extinción (la transición de energía $E_{0,1}$ en la **Figura 4**) de menor energía denota la primera transición excitónica.

Tabla 1. Energía de la banda prohibida y radio de Bohr de semiconductores del grupo II-VI y IV-VI con QDs relevantes en aplicaciones.

Material	Banda Prohibida (eV)	Radio de Bohr (nm)
CdS	2.42	2.8
CdSe	1.74	5.3
CdTe	1.49	7.5
PbS	0.37	20
PbSe	0.27	46

En la **Tabla 1** se dan tanto el radio de Bohr como la energía de la banda prohibida de algunos semiconductores en volumen de los grupos II-VI y IV-VI, que son comúnmente utilizados en distintos tipos de aplicaciones. Como se puede ver, los semiconductores del grupo IV-VI, basados en plomo, presentan un radio de Bohr mucho mayor que el de los del grupo II-IV, basados en cadmio, por lo tanto, los efectos de confinamiento cuántico se pueden observar, en QDs del grupo IV-VI para tamaños del QD mucho mayores que para los del grupo II-IV.

Además, las energías de las bandas prohibidas de los semiconductores basados en plomo son mucho menores que para los semiconductores basados en cadmio, con lo cual los picos de extinción y emisión de los QDs basados en Pb se encuentran en el infrarrojo mientras que tanto los picos de extinción como las emisiones de los QDs basados en cadmio se encuentran en el visible. Esta es una de las razones por las que los QDs basados en cadmio han sido los más utilizados popularmente en aplicaciones de fluorescencia, imagen y como sensores, debido a la mayor facilidad de acceso a tanto a fuentes de excitación (láseres y lámparas) como a detectores que trabajan en el visible frente a los que lo hacen en el infrarrojo.

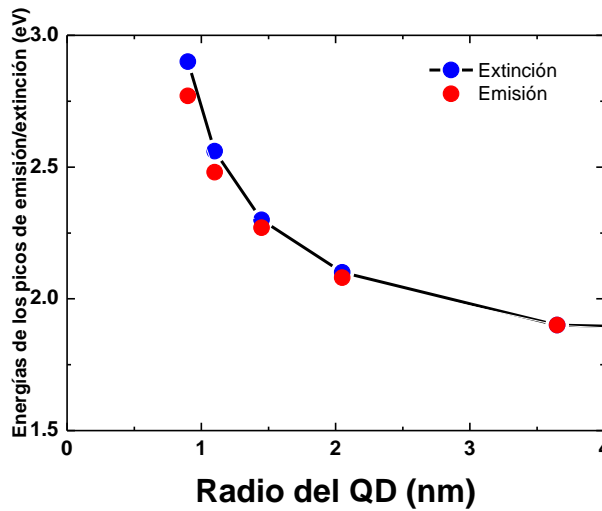


Figura 6. Energía del primer pico de excitón (extinción) y la emisión del CdSe-QD en función de su radio. Los datos han sido extraídos de la Figura 5, la línea actúa como una guía para los ojos.

En la **Figura 6** se ha representado el primer pico de excitón (obtenido de la **Figura 5 (a)**) en función del radio del CdSe-QD para radios inferiores a 10 nm.

La mencionada **Figura 6** muestra claramente como el primer pico de excitón se desplaza a energías mayores al reducir el radio del QD. La aproximación más simple para explicar este comportamiento es utilizar la llamada “Aproximación de Masa Efectiva”, la cual considera el confinamiento cuántico de un electrón y un hueco aislados en una esfera, asumiendo que las masas efectivas de dichas partículas son las mismas que las del material en volumen. (Dresselhaus 1956) La solución de la ecuación de Schrödinger en este caso lleva a niveles de energía discretos (denotados por los números cuánticos, n y l), como se puede ver en la **Figura 4**.

La transición de energía entre estos niveles, $E_{n,l}$, es mayor que la de la banda prohibida del material en volumen E_g . Entre ambas energías hay una diferencia de energía, $\Delta E_{n,l}$, de tal manera que $E_{n,l} = E_g + \Delta E_{n,l}$ viniendo $\Delta E_{n,l}$ dado por:

$$\Delta E_{n,l} = \frac{h^2 \alpha_{n,l}^2}{8\pi^2 R^2 \mu} \quad (3)$$

Siendo $\alpha_{n,l}$ un valor adimensional correspondiente a las diferentes transiciones. Por ejemplo, para $n=1$ y $l=0$ (estado s) $\alpha_{1,0} = \pi$ (Koch) . Por tanto, la primera transición de extinción que se podrá observar ($E_{1,s \rightarrow 1,s} = E_{1,0}$) debería ser del tipo $E_{1,s \rightarrow 1,s} - E_g \propto \frac{1}{R^2}$. Sin embargo, al analizar en detalle la **Figura 6** esta dependencia con $\frac{1}{R^2}$ no se observa. De hecho, en esta primera aproximación se considera que el electrón y el hueco son independientes, pero en realidad el excitón involucra pares electrón-hueco, con lo que ambas partículas se atraen mediante una interacción de Coulomb. Por tanto, cuando el tamaño del cristal es menor que el radio de Bohr, la dependencia de la interacción de Coulomb del par electrón-hueco con el radio del cristal deberá ser tomada en cuenta, por lo que la primera transición de excitón ($E_{1,s \rightarrow 1,s} = E_{1,0}$) debería aparecer en una energía dada por:

$$E_{1,0} = E_g + \Delta E_{1,0} - E_{exc} \quad (4)$$

donde $E_{exc} = \frac{1}{R} \left(\frac{1.8e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \right)$ describe la interacción efectiva de Coulomb del par electrón-hueco.(Koch)

Esta interacción de Coulomb entre el electrón y el hueco añade dificultad a la hora de resolver el problema de determinar las transiciones de energía en nuestros QDs. De hecho, para realizar un cálculo realista, aspectos tales como la variación de la constante dieléctrica, ϵ_r , y las condiciones de contorno de las funciones de onda (ya que el potencial del QD en la superficie no es infinito) deberían también tenerse en cuenta. Para solventar estos problemas, Meulenberg et al. determinaron experimentalmente la energía de enlace ($E_{1,0} - E_g$) de CdSe-QDs en función de su tamaño utilizando espectroscopia de absorción y fotoemisión de rayos X. (Meulenberg et al. 2009) Estos autores estimaron una dependencia más compleja debida a diferentes factores de escala que se derivan

de formas de las bandas de valencia ($\frac{1}{R^{1.6}}$) y conducción ($\frac{1}{R^{0.6}}$), que está en mejor acuerdo con cálculos previos.(Franceschetti and Zunger 1997) De hecho, a día de hoy no existe un modelo teórico exacto para el cálculo del tamaño del QD a partir de la posición de la extinción del primer pico de excitón.

Sin embargo, y a este respecto, es importante señalar la existencia de trabajos experimentales en los que se ha medido sistemáticamente el espectro de extinción de QDs de distintos tamaños y materiales semiconductores. Por ejemplo, el grupo de Yuet et al midieron detalladamente los espectros de extinción de QDs de CdTe, CdSe y CdS con distintos tamaños.(Yu et al. 2003) Este estudio puede utilizarse como guía a la hora de medir el tamaño de QDs de estos semiconductores a partir de la posición del pico de extinción. Como ejemplo podemos ver en la **Figura 7** las curvas de calibración para tres diferentes tipos de QDs basados en el Cadmio. Estas curvas son muy útiles para determinar el diámetro a partir de la longitud de onda del primer pico de excitón.

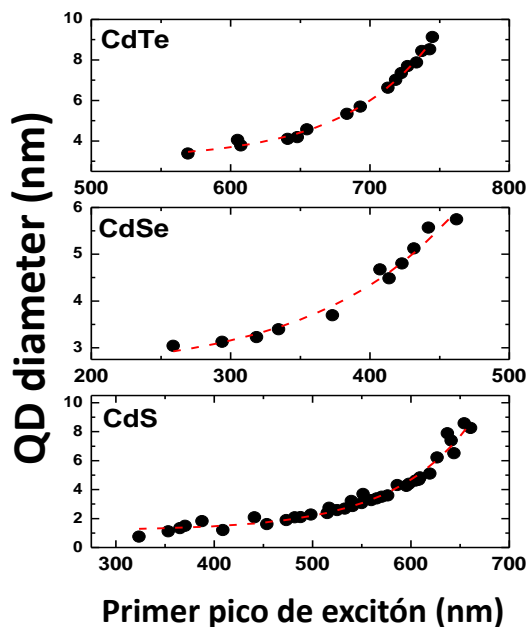


Figura 7. Curvas de calibración de tamaño de QDs determinados por W. William Yu et al. para CdTe, CdSe y CdS QDs a partir del primer pico de excitón. Los puntos son los datos experimentales mientras que las líneas son el mejor ajuste (polinómico) a los puntos.(Yu et al. 2003)

La **Figura 5** también incluye los espectros de emisión de CdSe-QDs de diferentes tamaños. Para cada tamaño se puede ver como la emisión consta de un solo pico de emisión simétrico y localizado en diferente longitud de onda. Estos picos de emisión están producidos por la desexcitación radiativa desde el nivel excitado más bajo de la excitación electrónica del QD (1s en la **Figura 4 (b)**) al nivel más alto del estado fundamental. De hecho, la excitación en longitudes de onda más cortas (energía más alta) que la del primer excitón lleva a emisiones de la misma longitud de onda debido a desexcitaciones no radiativas hasta el mencionado nivel del primer excitón. En la **Figura 6** también se ha indicado la dependencia de la energía del pico de emisión para cada tamaño de QD, que se puede comparar con la posición de los picos de extinción. Los picos de emisión siguen una tendencia similar a la observada con el primer pico de excitón; al disminuir el tamaño del QD, las energías de los picos de emisión aumentan.

Sin embargo, es importante señalar la existencia de un pequeño desplazamiento hacia el rojo de la emisión frente al pico de extinción del primer excitón. Esta diferencia en longitudes de onda, normalmente conocida como "*Stokes shift*", es en una característica general, normalmente encontrada en estados localizados y que en semiconductores ocurre porque los procesos de excitación y emisión normalmente involucran diferentes niveles de energía. De hecho, la estructura detallada tanto del nivel excitado como del nivel fundamental es mucho más compleja que la mostrada en la **Figura 4 (b)**. En particular, el primer nivel de excitón en un cristal está desdoblado debido al campo cristalino y la interacción electrón-hueco, llevando a transiciones prohibidas (excitones oscuros) y permitidas (excitones brillantes). Esta estructura fina es la que hace que aparezca el *Stokes shift* de la emisión del QD ya que entre la excitación y emisión involucran diferentes pares de niveles y la emisión también es mediada mediante desexcitaciones no radiativas.(Efros et al. 1996) Más aún, defectos superficiales del QD pueden producir también un desplazamiento hacia el rojo en la emisión.(Dantas et al. 2002) También es importante señalar que el Stokes shift decrece al aumentar el tamaño del QD, siendo despreciable para radios mayores a 3.5 nm (ver **Figura 6**).

2.2. Dependencia de la luminiscencia de QDs con la temperatura.

Algunas de las características (intensidad de la emisión, tiempo de decaimiento de la emisión, posición espectral de la emisión, ancho de banda y “*Stokes shift*”) luminiscentes de los QDs se ven afectadas por variaciones en la temperatura. Este apartado se centrará en la descripción fundamental de esta dependencia, mientras que en el **Capítulo 5**, se estudiará la aplicación de distintos tipos de QDs como nanotermómetros.

2.2.1. Cambios en la posición espectral de la emisión debidos a la temperatura.

Los cambios en la posición espectral de la emisión debidos a variaciones de temperatura están fundamentalmente relacionados con la variación del primer pico de excitón con la temperatura. De hecho, como se muestra en la **Figura 6**, la posición del pico de emisión está muy cercana al primer pico de excitón, separadas tan sólo por un pequeño “*Stokes shift*”, que obviamente también dependerá de la temperatura. La posición espectral del primer pico de excitón depende de varios efectos dependientes de la temperatura; la expansión térmica del semiconductor, los cambios producidos por la temperatura en la energía de confinamiento y los cambios producidos por la temperatura en la interacción electrón-fonón. Olkhovest et al investigaron en gran detalle estos efectos en QDs del grupo IV-VI. (Olkhovets et al. 1998) En particular los QDs de este tipo basados en el plomo son unos sistemas excelentes para investigar efectos relacionados con el tamaño del QD ya que, como se puede ver en la **Tabla 1**, tienen un radio de Bohr muy grande y por tanto los efectos de confinamiento se empiezan a ver con tamaños relativamente grandes; mucho mayores que en el caso de los semiconductores del grupo II-VI. La **Figura 8** muestra, a modo de ejemplo relevante, los cambios en el espectro de absorción debidos a la temperatura (para temperaturas bajas) de dos tamaños diferentes de PbS-QDs (8.5 nm y 4.5 nm de radio). En ambos casos, se puede observar un desplazamiento a longitudes de onda menores en el primer pico de excitón según se va aumentando la temperatura. Además, la sensibilidad del primer pico de excitón ($\frac{dE_{1,0}}{dT}$) con la temperatura es claramente dependiente del tamaño del QD.

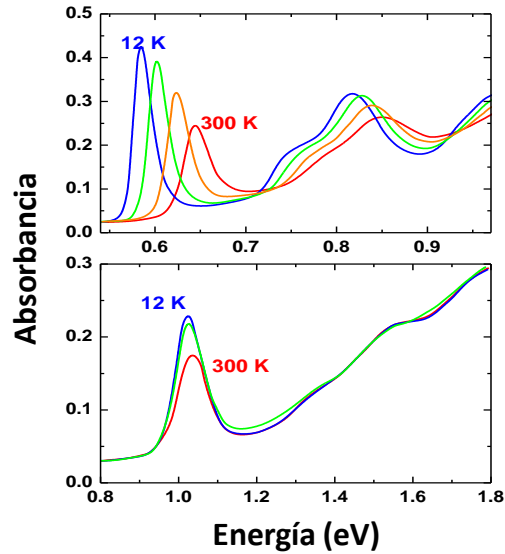


Figura 8. Espectro de absorción de PbS-QDs de dos tamaños diferentes (8.5 nm y 4.5 nm de radio) y a diferentes temperaturas encontrados por Olkhovets et al. (Olkhovets et al. 1998)

Olkhovets et al estudiaron la sensibilidad de distintos tamaños PbS-QDs embebidos en diferentes matrices (fosfato vítreo, oxido vítreo y polímeros) y explicaron el comportamiento observado considerando tres contribuciones principales a $\frac{dE_{1,0}}{dT}$, de manera que:

$$\frac{dE_{1,0}}{dT} \approx \left(\frac{\partial E_{1,0}}{\partial T} \right)_{\text{matriz}} + \left(\frac{\partial E_{1,0}}{\partial T} \right)_{\text{confinamiento}} + \left(\frac{\partial E_{1,0}}{\partial T} \right)_{\text{electrón-fonón}} \quad (5)$$

donde el primer término de la derecha está relacionado con la expansión térmica de la matriz, el segundo con el cambio de la energía de confinamiento cuántico y el tercero a los cambios producidos en la interacción electrón-fonón. Estos términos pueden ser explicados de la siguiente manera:

- El término relativo a la expansión térmica de la matriz tiene en cuenta el efecto en la energía de la primera transición excitónica como resultado de la expansión térmica del parámetro de red, a , del QDs. Lo cual puede expresarse de la siguiente manera:

$\left(\frac{\partial E_{1,0}}{\partial T} \right)_{matriz} = \frac{\partial E_{1,0}}{\partial a} \cdot \frac{\partial a}{\partial T}$. En el PbS, este término crece con el tamaño del QD hasta alcanzar el valor del material en volumen ($\approx 340 \mu\text{eV} / K$). La contribución a la sensibilidad térmica puede verse en la **Figura 9** (línea naranja, matriz)

- La expansión térmica (tamaño del QD) implica un menor confinamiento cuántico y, por tanto afecta al término de confinamiento cuántico ($\Delta E_{1,0}$ en la **ecuación (4)**), por lo que podremos escribir:

$$\left(\frac{\partial E_{1,0}}{\partial T} \right)_{confinamiento} = \frac{\partial E_{1,0}}{\partial R} \cdot \frac{\partial R}{\partial T} = \frac{\partial E_{1,0}}{\partial R} \cdot \alpha R \quad (6)$$

siendo α el coeficiente de dilatación térmica del QD y R su radio. De acuerdo con las expresiones **(3)** y **(6)** se puede escribir que:

$$\left(\frac{\partial E_{1,0}}{\partial T} \right)_{confinamiento} \propto -\frac{\alpha}{\mu} \cdot \frac{1}{R^2}, \text{ con lo que este término, como se}$$

puede ver, conlleva una sensibilidad térmica negativa. Este término decrece (en valor absoluto) según el tamaño del QD aumenta. Para el caso de las PbS-QDs este término sólo es relevante para tamaños menores a 4 nm (ver línea de puntos roja en la **Figura 9**)

- El término de acoplamiento electrón-fonón se desprende de la naturaleza discreta de los niveles de energía en los QDs. En particular se consideran dos contribuciones cuando los electrones se mueven desde niveles ocupados (niveles de huecos, en el estado fundamental en la **Figura 4 (b)**) a niveles no ocupados (niveles de electrones en estados excitados en la **Figura 4 (b)**): un término “intrabanda”, que liga estados de portadores iguales (electrón-electrón o hueco-hueco), y un término “interbanda”, el cual liga estados de portadores distintos (electrón-hueco). Este último término, en el caso de los PbS-QDs es siempre positivo y crece linealmente con el tamaño del QD como puede observarse en la **Figura 9** (línea de puntos azul). Sin embargo, el término intrabanda es siempre negativo y proporcional al factor de acoplamiento (factor de Huang-Rhys (Zhao and Kalt 2003)), S , que

también depende del radio del QD para QD pequeños (**Figura 9** línea verde)

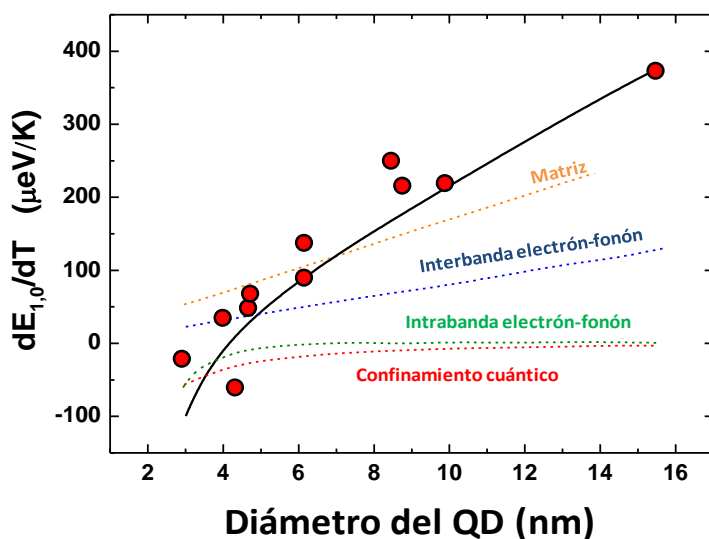


Figura 9. Sensibilidad térmica de PbS-QDs en función del diámetro del QD. Las líneas de puntos representan las diferentes contribuciones a la sensibilidad térmica. Datos de (Olkhovets et al. 1998).

La suma de las contribuciones arriba explicadas (línea negra en la Figura 9) está en bastante consonancia con los datos experimentales encontrados (puntos en la Figura 9). Por tanto, podemos ver que para PbS-QDs mayores a

aproximadamente 5 nm los valores de $dE_{1,0}/dT$ ocurren de tal manera que la fluorescencia de los QDs experimenta un desplazamiento hacia el azul con la temperatura. Es más, para estos QDs la sensibilidad térmica se incrementa con el tamaño del QD, ya que los términos de acoplamiento interbanda electrón-fonón y de dilatación de la matriz son dominantes. Para QDs muy pequeños $dE_{1,0}/dT$ es negativo, por lo que para estos QDs, la fluorescencia sufre un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores al aumentar la temperatura, debido al carácter dominante del término de acoplamiento intrabanda electrón-fonón y el debido al confinamiento cuántico para estos QDs tan pequeños.

2.2.2. La importancia de la superficie.

Como ya se ha visto en la sección anterior, la variación de las propiedades luminiscentes con la temperatura en los QDs puede verse muy afectada por el entorno de la nanopartícula. En esta sección se discutirá brevemente la importancia de la superficie en el desplazamiento térmico de la longitud de onda de emisión. Como se vio en la **sección 2.2.1**, el desplazamiento del pico de emisión está fundamentalmente causado por la dependencia con la temperatura del primer pico de excitón que aparece en el espectro de extinción, el cual puede variar por una combinación de efectos, entre los cuales se incluye la dilatación de la matriz con la temperatura, el cambio en el acoplamiento electrón-fonón y los cambios en el confinamiento cuántico debidos a la temperatura (ver **Figura 9**). En algunos casos, como en los de QDs semiconductores de los grupos II-IV, la variación del tamaño del QDs debida a la temperatura es pequeña debido a su pequeño factor de dilatación térmica. Sin embargo, asumir que el coeficiente de expansión térmica de un QDs semiconductor de los grupos II-IV depende sólo de su matriz sólo es correcto para QD grandes (> 10 nm). En este tipo de QDs tan sólo una pequeña fracción de sus átomos se encuentran en la superficie. Sin embargo, para QDs de estos grupos de tamaño pequeño pasará justo lo contrario. La mayoría de sus átomos se encontrarán en la superficie (se estima que el 35% de los átomos de un CdTe-QD de 3 nm se encuentra en la superficie, ver **sección 4.1.1.1**). En este caso, el coeficiente de expansión térmica del QD vendrá dado por el coeficiente de expansión térmica efectivo que estará influenciado por las propiedades de los átomos superficiales. Por tanto, el tratamiento de la superficie del QD tendrá una gran influencia en el coeficiente de expansión térmica del QDs y, consecuentemente, en los cambios en el confinamiento cuántico inducidos por la temperatura. Este hecho ha sido estudiado por Zhou et al, quienes analizaron en detalle la sensibilidad térmica de CdTe-QDs con diferentes tratamientos superficiales. (Zhou et al. 2013) En particular, y como se puede ver en la **Figura 10 (a)**, los autores decoraron la superficie de CdTe-QDs dispersables en agua con un compuesto (per-6-thio- β -cyclodextrin, β -CD) constituido por al menos seis anillos de glucopiranososa que presentan una rotación sobre los enlaces C-O ante cambios de temperatura. (Wood et al. 1977)

Cuando los complejos β -CD se unen a la superficie de un QD, estas rotaciones inducidas por temperatura crean unas fuerzas de torsión en la

superficie del QDs que se transmiten a la matriz del nanocrystal aumentando el desplazamiento del pico de emisión del QD. Esto se puede ver claramente en la **Figura 10 (b)** que incluye el desplazamiento del pico de emisión para CdTe-QDs decorados con ácido 3-mercaptopropionico (MPA) y β -CD. Como se puede ver, la existencia de estas torsiones casi dobla la sensibilidad térmica de los QDs.

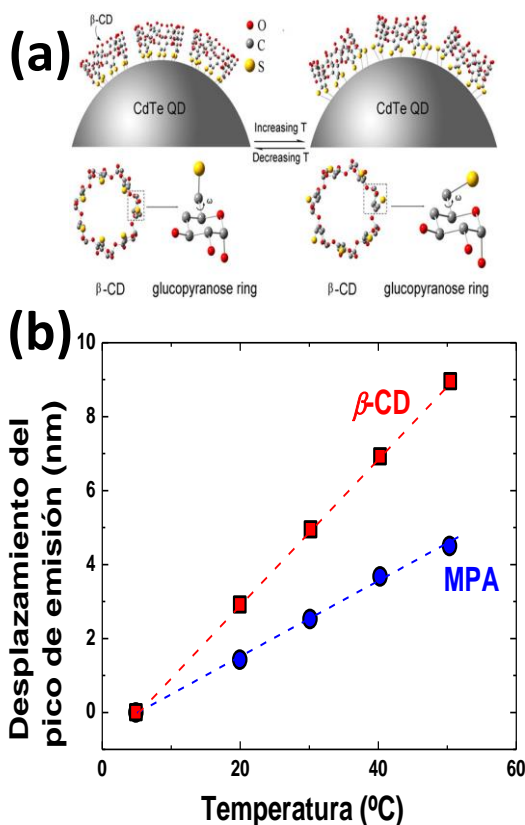


Figura 10. (a) Esquema que muestra el cambio de rotación en la molécula de β -CD. Para poder visualizarlo mejor, los átomos de hidrógeno no se muestran. (b) Desplazamiento del pico de emisión de CdTe-QDs decorados con β -CD y MPA CdTe-QDs. Los puntos son los datos experimentales mientras que las líneas son los ajustes lineales.

La existencia de estrés relacionado con la superficie, evidenciado en el trabajo de Zhou et al, puede explicar también la controversia sobre la sensibilidad de térmica de los QDs, ya que según algunos autores cuánto menor es el tamaño del QD, mayor es su sensibilidad térmica mientras que para otros esta sensibilidad es independiente del tamaño del QD.(Zhou and Zhang 2013) La explicación a este fenómeno puede deberse al papel que juega la funcionalización de la superficie en

el coeficiente de expansión térmica efectivo del QD. Si esta funcionalización conlleva una fuerza adicional a la que experimenta el propio QD, la contribución al coeficiente de expansión térmica efectivo será mayor cuanto menor sea el QD, debido a un mayor ratio superficie-volumen. Sin embargo, si la funcionalización no crea estrés adicional, la sensibilidad térmica debería ser independiente del tamaño.

Por último cabe destacar que una elección adecuada de la funcionalización de la superficie también puede mejorar la estabilidad de los QDs en los ciclos de calentamiento y enfriamiento.

2.2.3. Disminución de la intensidad de la luminiscencia con la temperatura.

Otro de los efectos de la temperatura sobre la fluorescencia de los QDs es la reducción de la intensidad de la emisión (conocido como “quenching”). Sin embargo, esta reducción en la intensidad de la luminiscencia, como se verá en el **Capítulo 5**, no viene acompañada por un cambio remarcable en la vida media, por lo que el decaimiento en la intensidad no puede deberse a puro quenching térmico, como se verá a continuación. Como para cualquier centro luminiscente, la eficiencia cuántica de la fluorescencia es dependiente con la temperatura. (Solé et al. 2005) En general para cualquier centro luminiscente (centros localizados), por encima de una temperatura dada, temperatura del quenching, la eficiencia de la fluorescencia empieza a decrecer. Para centros emisores localizados, tales como dopantes ópticos en cristales aislantes, hay dos mecanismos que pueden explicar el quenching térmico:

1. Un diferente acoplamiento electrón-fonón de los estados excitados y fundamental (factores de Huang-Rhys elevados).
2. Una relajación multifonónica de los centros luminiscentes, lo que ocurre cuando se tienen fonones efectivos de alta energía de modo que la banda prohibida entre el estado excitado y el fundamental corresponde a pocos (unos cinco o menos) fonones efectivos. (Imbusch 1989, Solé et al. 2005)

Sin embargo, el quenching térmico en QDs de semiconductores no está relacionado con estos mecanismos y presenta mecanismos más complejos que los correspondientes a centros localizados. En QDs los procesos de quenching térmico de la luminiscencia suelen estar relacionados con activación térmica (de fotoionización) de los portadores de carga (electrones o huecos), de tal manera que al aumentar la temperatura tienden a estar más deslocalizados y alcanzar estados conocidos como trampas de la luminiscencia. Por ejemplo, podemos pensar en un excitón donde la temperatura se ha incrementado hasta contrarrestar la atracción de Coulomb hasta que se alcanza un estado trampa. En QDs semiconductores los estados trampa son normalmente estados superficiales, y, consecuentemente, el entorno en el que se encuentre el QD será tremendamente influyente en la variación de la fluorescencia debida a los cambios de temperatura. Las trampas (y debido a defectos superficiales) se han utilizado para explicar la disminución de la fluorescencia por quenching de QDs a partir de 50 K. (de Mello Donegá et al. 2006, Jing et al. 2009, Zhao et al. 2012) De hecho, para reducir los defectos (trampas) superficiales, la estrategia que se utiliza es la de encapsular el QD dentro de otro material semiconductor, llevando a sistemas de núcleo y corteza ("core-shell"). También es muy importante el entorno en el que los QDs se depositen. Un buen ejemplo de trabajo explicativo sobre la reducción de la intensidad luminiscente sobre la temperatura ambiente de estructuras "core-shell" de QDs es el llevado a cabo por Zhao et al. (Zhao et al. 2012) En este trabajo, los autores estudian la influencia de diversos ambientes en la eficiencia cuántica de varios tipos de QDs. En la **Figura 11** se puede observar, a modo de ejemplo, la importancia del ambiente en la variación de la intensidad de la fluorescencia con la temperatura. En este caso se trataba de estructura de QDs de CdSe (core) con una doble envoltura (double-shell) de CdS/ZnS (a fin de minimizar las trampas superficiales).

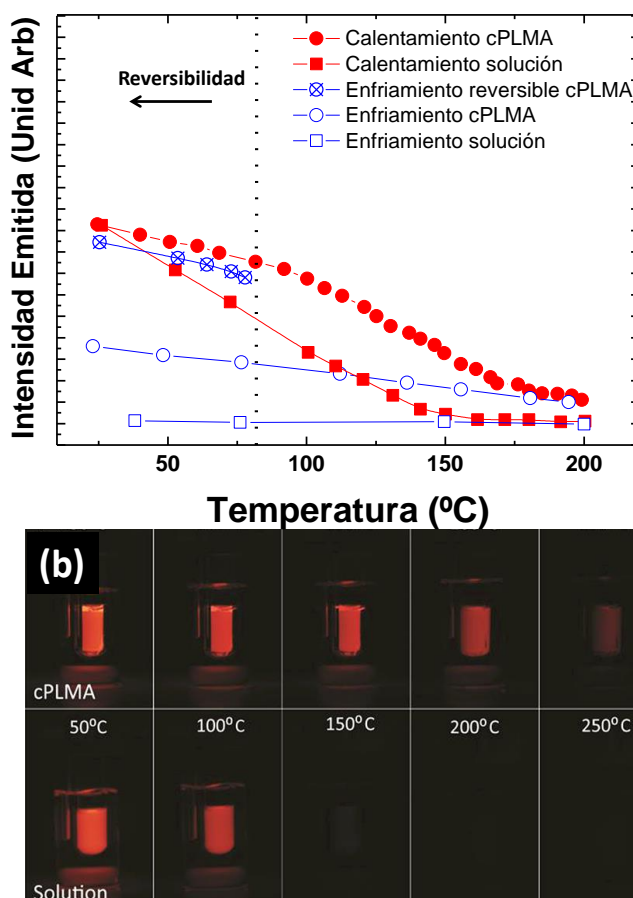


Figura 11. (a) Intensidad normalizada en función de la temperatura para CdSe/CdS/ZnS (core/shell/shell)-QDs, diámetro del core de 3.8 nm y tamaño total de la nanopartícula de 7 nm en dos ambientes diferentes. Los símbolos rellenos corresponden a los ciclos de calentamiento mientras que los símbolos no rellenos corresponden a los ciclos de enfriamiento. (b) Imágenes correspondientes a las soluciones bajo excitación UV. (Zhao et al. 2012)

En esta figura se puede ver la dependencia de la intensidad de la emisión normalizada con la temperatura de estos QDs dispersos en dos ambientes distintos, un líquido con un alto punto de ebullición (octadeceno, ODE, $C_{18}H_{36}$) y una matriz de polímero sólido (cPLMA). La disminución en la intensidad de emisión es claramente diferente en ambos ambientes. Como puede verse, dicho quenching es significativamente más rápido para los QDs dispersados en líquido que para los que se encuentran en el sólido. De hecho, como puede verse en las imágenes de la **Figura 11 (b)**, a 150 °C la señal fluorescente de la solución líquida

ha desaparecido mientras que para los QDs embebidos en el sólido puede verse señal hasta los 200°C. Un aspecto importante a tener en cuenta mirando la figura es que la dependencia de la intensidad de la emisión con la temperatura durante los procesos de calentamiento. En realidad lo que ocurre es que los procesos son irreversibles una vez que se sobrepasa cierto rango de temperatura. Zhao et al. Demostraron que por debajo de unos 100°C los procesos son reversibles. Por ejemplo estos efectos de reversibilidad e irreversibilidad estos autores asumen la creación de “estados trampa” que se crean durante el proceso de calentamiento (ver **Figura 12**). Estos estados trampa pueden ser de dos tipos, permanente (**Figura 12 (a)**), (procesos irreversibles) y temporales (**Figura 12 (b)**) (procesos reversibles). Estos estados, junto con la presencia de estados trampa y persistentes en el QD (ver **Figura 12 (b)**) serían para explicar el complejo quenching térmico de la luminiscencia de los QDs. Cabe aquí destacar que en esta tesis los procesos de calentamientos estudiados no alcanzan temperaturas superiores a 60°C, por lo que, como se verá, todos los resultados son reversibles.

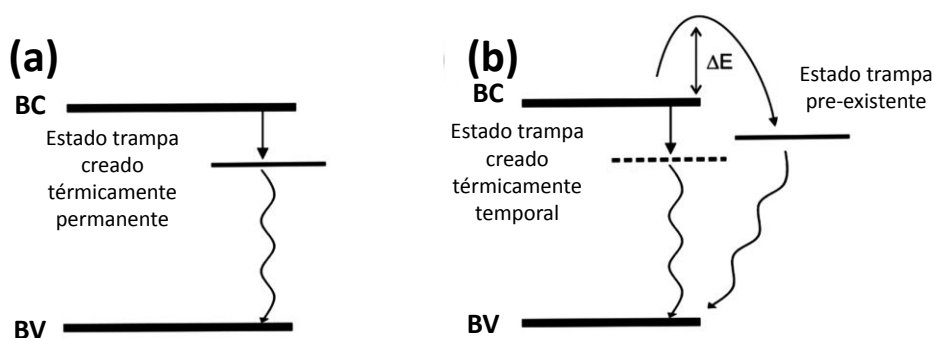


Figura 12. Esquema de niveles de energía que presentan los diferentes mecanismos de quenching térmico de la fluorescencia de QDs.

2.2.4. Variación del decaimiento temporal de la luminiscencia con la temperatura.

Como consecuencia de lo mencionado en el apartado anterior, la variación del tiempo de decaimiento de la luminiscencia con la temperatura no sigue el mismo comportamiento de la variación de la intensidad con la temperatura (Zhao et al. 2012), hecho que será experimentalmente corroborado en este trabajo (ver **Capítulo 5**).

3. Nanopartículas metálicas.

Introducción.

El oro ha sido uno de los temas de investigación más antiguos de la ciencia y hoy en día su investigación experimenta un crecimiento exponencial en el número de publicaciones, especialmente en el contexto de la nanociencia y la nanotecnología. El oro es el metal más estable y presenta unos aspectos fascinantes como sus aplicaciones polivalentes en muchos ámbitos de la ciencia incluyendo la ciencia de materiales; electrónica; magnetismo; óptica; catálisis y biología; por lo que puede ser un elemento clave de la construcción de la ciencia del siglo XXI. (Daniel and Astruc 2004)

A pesar de que la extracción de oro empezó en el quinto milenio antes de Cristo en Bulgaria y alcanzó las diez toneladas por año en el Egipto de los años 1200-1300 antes de Cristo cuándo la maravillosa estatua de Tutankamón fue construida, es probable que el oro en dispersión acuosa apareciera sobre el siglo quinto antes de Cristo en Egipto y China. En la antigüedad el oro fue utilizado tanto con motivos estéticos como curativos. Se utilizó oro coloidal para conseguir colorear cerámicas, uso que todavía se le da hoy en día. (Daniel and Astruc 2004)

Posiblemente uno de los ejemplos más famosos de esta aplicación de los coloides de oro es la copa de Lycurgus, que fue fabricada a mediados del siglo cuarto antes de Cristo.



Figura 13. Copa de Lycurgus, fabricada con coloides de oro a mediados del S IV a.C. que presenta un color verde a la luz reflejada y un color rojo a la luz transmitida.

Esta copa, como se puede apreciar en la **Figura 13**, presenta un color verde cuando es iluminada desde el exterior y un color rojo, debido a la presencia de coloides de oro. Cuando la copa es vista con luz reflejada, las partículas son lo suficientemente grandes para reflejar la luz, sin eliminar la transmitida; sin embargo cuándo se ilumina con luz transmitida las nanopartículas esparcen (“scatterean”) la luz, con lo que la luz azul se sufre una mayor desviación y la luz transmitida es la roja. (Daniel and Astruc 2004)

Durante la Edad Media el oro gozó de una reputación como un material con propiedades curativas para distintas dolencias tales como problemas cardiacos, venéreos, disentería, epilepsia, tumores y el diagnóstico de la sífilis. Esto está bien detallado en el que se considera el primer libro sobre oro coloidal publicado por el filósofo y médico Francisci Antonii en 1618. (Antonii 1618) En su obra, Antonii incluye información sobre la fabricación de soluciones de coloides de oro y sus usos médicos, incluyendo casos prácticos. Pocos años después, en 1676, el químico alemán Johann Kunckels publicó un libro en cuyo capítulo siete discute sobre las propiedades curativas de soluciones que contienen coloides de oro (Kunckels 1676) llegando incluso a proponer que, para que el oro fuera dispersable en el agua, debía ser preparado en porciones tan pequeñas que no fueran visibles para el ojo humano. A pesar de que el uso más común de los coloides de oro en medicina durante la Edad Media era para el diagnóstico de la sífilis, un método que se ha seguido utilizando hasta el S. XX, esta prueba no es completamente fiable. (Kahn 1928, Hauser 1952)

La era moderna del estudio de los coloides de oro empieza hace algo más de 150 años, con el trabajo de Michael Faraday, que fue el primero en observar que las propiedades de oro coloidal eran distintas a las de oro en material en volumen. (Boyde 1991)

Ya en el siglo XX, los métodos de síntesis de nanopartículas de oro, incluyendo tanto aquellas de forma esférica como otras geometrías más complicadas, son dominados por la comunidad científica, así como la posibilidad de recubrir estas nanopartículas con diferentes grupos, tales como oligonucleitos, proteínas o anticuerpos que las dotan de mayor funcionalización. (Giljohann et al. 2010)

En los últimos años, la investigación en nanopartículas de oro y sus propiedades ha conducido al desarrollo de avances con gran potencial en el campo de la biología y la medicina.(Giljohann et al. 2010)

En este capítulo se estudiarán las propiedades ópticas de nanopartículas metálicas, prestando una atención especial a las de oro, por sus grandes aplicaciones en biomedicina. También se estudiarán los mecanismos de disipación de calor en este tipo de nanopartículas. Al final del capítulo se también se estudiarán las propiedades ópticas y de disipación de calor de nanopartículas de carbono, por su biocompatibilidad.

3.1. Propiedades ópticas de nanopartículas metálicas.

Las nanopartículas de metales nobles, en especial las de oro, tienen un gran potencial asociado al desarrollo de sistemas de diagnóstico y de terapia contra el cáncer, debido principalmente a sus propiedades ópticas.(Jain et al. 2007)

La eficiencia de absorción de una partícula está dada por su sección eficaz de absorción, σ_{abs} . Clásicamente este parámetro corresponde a la sección geométrica de una partícula opaca ideal que absorba el mismo número de fotones que la partícula a estudio, como se puede ver en la **Figura 14 (a)**.

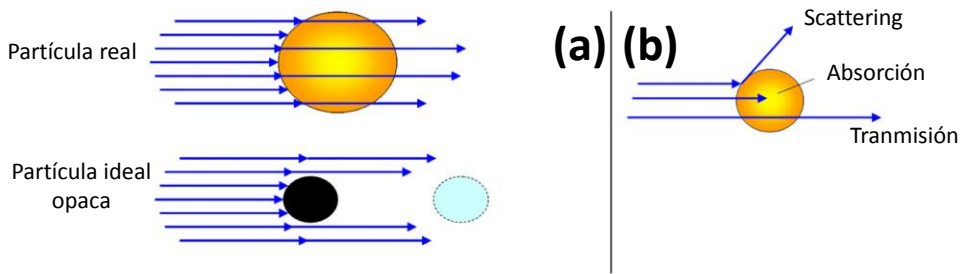


Figura 14. (a) Ilustración del concepto de sección eficaz de absorción. (b) Descripción gráfica de los procesos de transmisión, absorción y scattering.(Garcia 2011)

Además de absorbida, la luz que interactúa con la materia puede ser también esparcida (scattering), cambiando la dirección de propagación y, eventualmente, su energía y momento. Se puede definir la sección eficaz de scattering, σ_{scat} , como la sección geométrica de una partícula ideal, la cual esparce toda la luz que incide sobre ella, con la misma eficiencia de esparcimiento (scattering) que la partícula real.

La suma de las secciones eficaces de absorción y scattering se conoce como sección eficaz de extinción, σ_{ext} , la cual representa la eficiencia de una partícula de extinguir los fotones de la luz incidente; ya sea mediante absorción o scattering, de tal manera que:

$$\sigma_{ext} = \sigma_{abs} + \sigma_{scat} \quad (7)$$

El valor máximo posible de la sección eficaz de extinción es la sección total de la partícula, $\pi \cdot R^2$.

Las propiedades ópticas de nanopartículas metálicas están descritas mediante una función dieléctrica compleja que cambia con la frecuencia de la luz incidente. Según Novotny y Hecht (Novotny and Hecht 2012), estas propiedades están determinadas básicamente por dos hechos:

1. Los electrones pertenecientes a la banda de conducción pueden moverse libremente por el metal.
2. Las excitaciones interbanda pueden tener lugar si la energía de los fotones excede la energía de la banda prohibida (gap) del material.

Por tanto, la función tendrá la siguiente forma:

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_R(\omega) + \varepsilon_I(\omega) \quad (8)$$

Siendo $\varepsilon_R(\omega)$ y $\varepsilon_I(\omega)$ las partes reales e imaginarias de la permitividad dieléctrica.

Posiblemente la propiedad más interesante de las nanopartículas metálicas en tamaño nanométrico es su resonancia de plasmón superficial (SPR por sus siglas en inglés). A pesar de que, por definición, un plasmón superficial corresponde a oscilaciones de densidades de carga superficiales, la misma terminología se utiliza para referirse a las oscilaciones colectivas de los electrones en la superficie de un metal. (Novotny and Hecht 2012)

La SPR consiste en una oscilación colectiva de los electrones libres del metal cuando son excitados con luz. Esta oscilación produce un gran aumento de la absorción y el scattering de la radiación electromagnética incidente en la banda del espectro correspondiente a la frecuencia SPR de estas nanopartículas. Esta frecuencia de resonancia, así como la proporción de absorción y scattering, dependen de la composición, tamaño y forma de las nanopartículas, de las propiedades dieléctricas del medio en el que se encuentren y de la interacción entre partículas.

Los metales nobles presentarán una fuerte absorción en el visible o ultravioleta cercano si el tamaño de la partícula es menor que el camino libre medio del electrón. (El-Sayed 2001)

El camino libre medio del electrón es una medida de la distancia media entre colisiones sucesivas entre portadores de carga. (Wong and Mengüç 2008) Para metales dicho camino libre medio es determinante porque los electrones son los portadores de carga dominantes. Esta propiedad es dependiente tanto del medio como de la energía de los portadores de carga.

A la frecuencia del SPR los electrones empiezan a oscilar coherentemente bajo una fuerza de recuperación proveniente del núcleo, como se puede ver en la **Figura 15**, cuando hay un acoplamiento fuerte entre los electrones y la radiación luminosa. Es interesante hacer notar que, esto ocurre en las regiones visible e infrarrojo del espectro. Por tanto, dependiendo de su tamaño y forma, las nanopartículas dan lugar a colores bien definidos en los medios que las contienen.

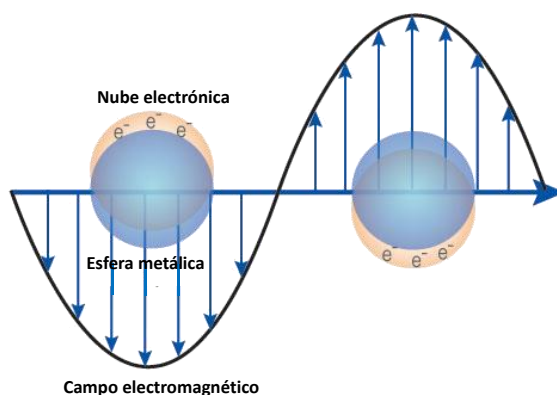


Figura 15. Campo eléctrico y distribución de carga en la superficie de una nanopartícula de tamaño mucho menor a la longitud de onda de la luz.

La superficie de la nanopartícula obviamente juega un papel muy importante en la observación de SPR ya que altera las condiciones de contorno para la polarizabilidad del metal, lo cual altera la resonancia. En este sentido, la SPR es un efecto de partículas de pequeño tamaño (o de capa fina) pero no es un efecto cuántico.

Mie fue el primero en explicar el color rojo de las dispersiones de nanopartículas de oro en soluciones. Resolviendo las ecuaciones de Maxwell para

un campo electromagnético interactuante con pequeñas esferas suponiendo la misma constante dieléctrica que la del material en volumen la solución de este cálculo (con las condiciones de contorno propias de una esfera) conduce a una serie de de oscilaciones multipolares para la sección eficaz de extinción de las nanopartículas. (Kerker 1969, Papavassiliou 1979, Müller 1996, Bohren and Huffman 2008) Mediante expansión de los campos en ondas parciales se pueden obtener las siguientes expresiones para la sección eficaz de extinción, σ_{ext} y la sección eficaz de scattering σ_{sca} : (Müller 1996)

$$\sigma_{ext} = \frac{2\pi}{|k|^2} \sum_{L=1}^{\infty} (2L+1) \text{Re}(a_L + b_L) \quad (9)$$

$$\sigma_{sca} = \frac{2\pi}{|k|^2} \sum_{L=1}^{\infty} (2L+1) \text{Re}(|a_L|^2 + |b_L|^2) \quad (10)$$

Siendo $\sigma_{ext} = \sigma_{abs} + \sigma_{sca}$ y $a_L = \frac{m\psi_L(mx)\psi_L'(x) - \psi_L'(mx)\psi_L(x)}{m\psi_L(mx)\eta_L'(x) - \psi_L'(mx)\eta_L(x)}$,
 $b_L = \frac{\psi_L(mx)\psi_L'(x) - m\psi_L'(mx)\psi_L(x)}{\psi_L(mx)\eta_L'(x) - m\psi_L'(mx)\eta_L(x)}$, con $m = n/n_m$, donde n es el índice de refracción complejo de la partícula y n_m el índice de refracción del medio que rodea a la partícula. k es la función de onda y $x = |k|r$, donde r es el radio de la partícula. ψ_L y η_L son las funciones cilíndricas de Ricatti-Bessel. La notación prima indica la derivada con respecto al parámetro entre paréntesis. L es un contador del número entero, de tal manera que $L=1$ corresponde al término dipolar, $L=2$ corresponde al término cuadrupolar y así sucesivamente.

Para partículas con radio r mucho menor que la longitud de onda máxima (λ_{max}) de la luz incidente $\left(2r < \frac{\lambda_{max}}{10}\right)$ tan solo el término dipolar contribuye significativamente a la sección eficaz de extinción. Por tanto, la sección eficaz de extinción se reduce a la siguiente relación (Kerker 1969, Papavassiliou 1979, Müller 1996, Bohren and Huffman 2008):

$$\sigma_{ext}(\omega) = 9 \frac{\omega}{c} \varepsilon_m^{3/2} V \frac{\varepsilon_2(\omega)}{[\varepsilon_1(\omega) + 2\varepsilon_m]^2 + \varepsilon_2(\omega)^2} \quad (11)$$

Siendo V el volumen de la nanopartícula, ω la frecuencia de la luz incidente, c la velocidad de la luz en el vacío y ε_m y $\varepsilon(\omega) = \varepsilon_1(\omega) + i\varepsilon_2(\omega)$ la constante dieléctrica del material que rodea a la nanopartícula y la de la nanopartícula respectivamente. Mientras la primera constante dieléctrica se asume independiente de la frecuencia, la constante $\varepsilon(\omega)$ es compleja y depende de la frecuencia. La condición de resonancia se alcanza para $\varepsilon_1(\omega) = -2\varepsilon_m$, si ε_2 es muy pequeña o muy poco dependiente en ω . (Müller 1996)

La **ecuación (11)** se utiliza para explicar los espectros de extinción de nanopartículas metálicas pequeñas tanto de manera cualitativa como cuantitativa. (Müller 1996) Sin embargo, para nanopartículas más grandes (mayores de 20 nm en el caso del oro) donde la aproximación dipolar no es válida, la SPR depende explícitamente del tamaño de la nanopartícula, ya que tanto como a_L como b_L dependen del radio de la partícula. Cuanto más grande es la partícula, más importante se convierten los órdenes multipolares ya que la luz no puede polarizar homogéneamente la nanopartícula. Los órdenes multipolares van teniendo sus picos a energías más bajas por lo que el SPR se va desplazando a longitudes de onda mayores según se va aumentando el tamaño de la nanopartícula. (Müller 1996)

Para nanopartículas grandes, las cuales no pueden considerarse menores que la longitud de onda de la luz, no se podrán describir como dipolos y se tendrá que recurrir a los términos multipolares. Como consecuencia, la banda de resonancia consta de en múltiples picos: dos picos para el cuadrupolo, tres pico para el octopolo, etc. (Kreibig et al. 1987) La **Figura 16** muestra la contribución de diferentes términos en la **ecuación (9)** a la sección eficaz de extinción de nanopartículas de oro.

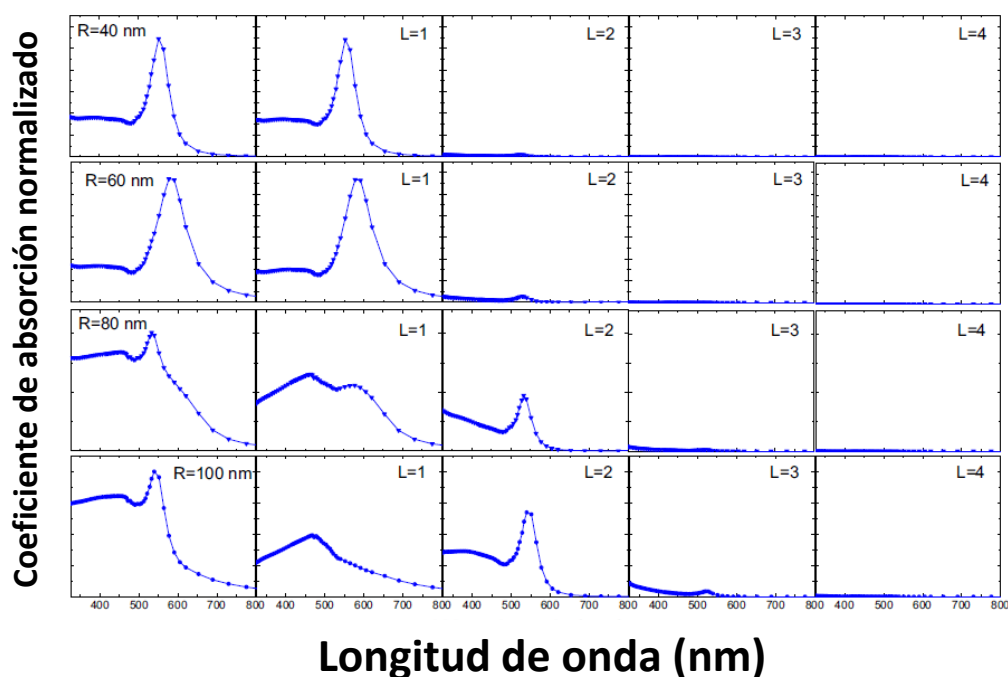


Figura 16. Espectro del coeficiente de absorción normalizado calculado según la teoría de Mie para un índice de refracción de 1.5 y para distintas contribuciones multipolares. La columna de la izquierda representa la contribución total al coeficiente de absorción.

La **Figura 17** presenta la sección eficaz de extinción frente a la longitud de onda de resonancia de plasmón superficial (λ_{SPR}) para diferentes nanopartículas metálicas esféricas de 10 nm de diámetro. Como se puede observar, para los metales nobles la sección eficaz mucho mayor que otros elementos. Esto quiere decir que la SPR equivale a concentrar la luz en la partícula para que esta presente una gran extinción.(Garcia 2011) En este punto es importante señalar que la absorción de la luz tiene una dependencia exponencial con la sección eficaz de absorción.

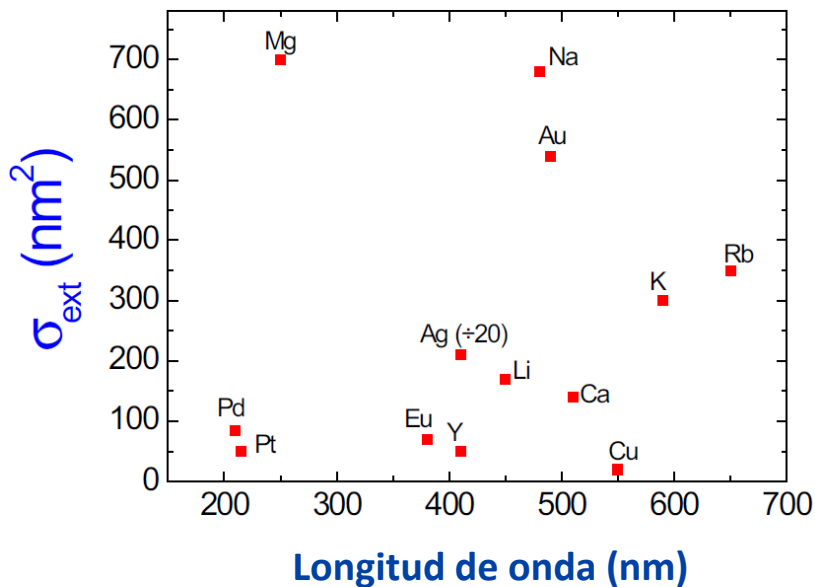


Figura 17. Sección eficaz de extinción frente a la longitud de onda de resonancia de plasmón superficial (λ_{SPR}) para partículas esféricas de 10 nm de radio en aire. (Garcia 2011)

La intensidad de la luz que se propaga en un medio extintor decae siguiendo la expresión de Lambert-Beer:

$$I(x) = I_0 \cdot e^{-C \cdot \sigma_{ext} \cdot x} \quad (12)$$

Donde I_0 es la intensidad inicial, C la concentración de nanopartículas por unidad de volumen y x la distancia recorrida por la luz. Por tanto, un pequeño aumento en la sección eficaz de extinción conlleva un gran aumento en la absorción de la luz. Un aumento en la sección eficaz de extinción de diez veces implica que la luz transmitida se verá reducida a un 0.04%.

Otra manera directa de ver la gran sección eficaz de extinción en nanopartículas es compararla con las correspondientes a transiciones interbanda. Además del SPR hay otro mecanismo de excitación electrónica en nanopartículas metálicas. En un material metálico la banda de valencia y la de conducción están entrelazadas formando un continuo de estados posibles para los electrones. Sin embargo, algunos niveles no están lo suficientemente separados para que este solapamiento sea total, permitiendo que el sistema presente bandas similares a las de los semiconductores. (Dresselhaus and Dresselhaus 1962) Las transiciones

entre estos niveles y la banda de conducción conlleva la aparición de un borde de absorción similar al que aparece en los semiconductores. De hecho, algunos metales presentan una débil luminiscencia debida a la transición de electrones entre estas bandas.(Mooradian 1969)

La **Figura 18** muestra los espectros de extinción para nanopartículas de plata (Ag NPs) y oro (Au NPs). En el caso de la plata, tanto las transiciones interbanda y la banda de SPR están bien resueltas. Para el oro ambas transiciones están superpuestas. Es importante tener en cuenta esta superposición al analizar la forma de la banda de SPR. Se puede observar como la extinción debido a la SPR es mucho mayor que la debida a las transiciones interbanda.

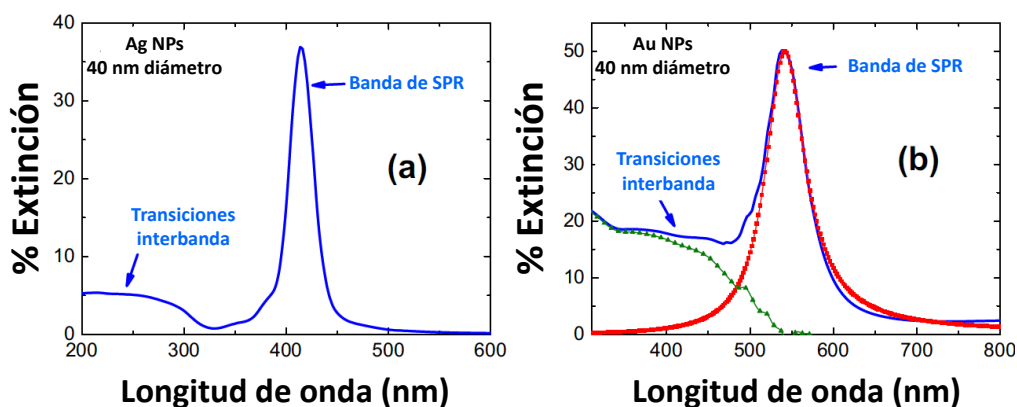


Figura 18. Espectro de extinción óptica para nanopartículas de plata, (a), y de oro (b) de 40 nm de diámetro embebidas en una matriz de silicio.

La razón para este comportamiento puede ser explicada teniendo en cuenta que, cuando la luz alcanza una nanopartícula, los electrones de conducción empiezan a moverse, lo cual crea una acumulación de carga en la superficie de la nanopartícula. Esta acumulación de carga crea un campo tanto dentro como fuera de la nanopartícula. Cuanto mayor sea la densidad electrónica y su movilidad, mayor será la acumulación de carga en la superficie de la nanopartícula y, consecuentemente, se formará un campo intenso en una región mayor al tamaño de la nanopartícula.

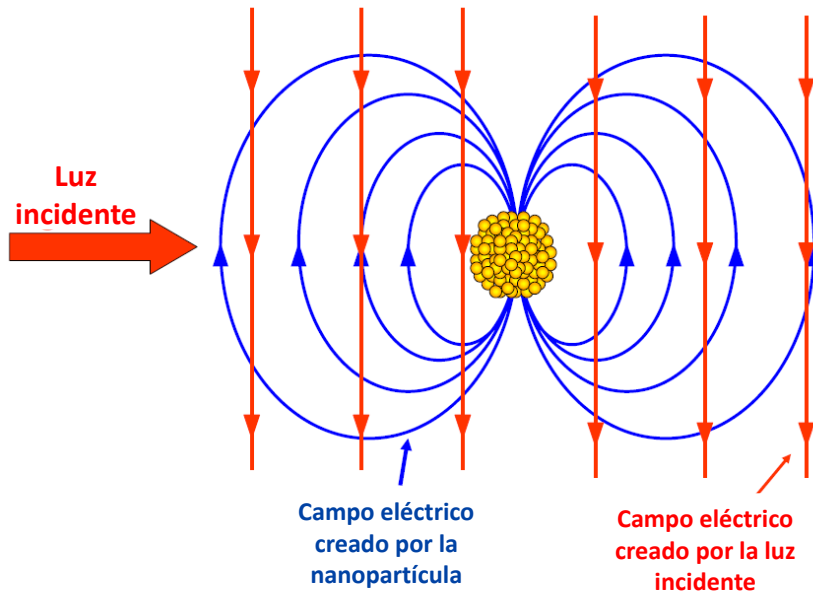


Figura 19. Ilustración en la que se presenta el campo eléctrico creado por la luz incidente y la oscilación de los electrones en la nanopartícula formada por una aglomeración de átomos. (García 2011)

Tal y como se muestra en la figura, hay regiones en las que el campo eléctrico creado por la nanopartícula se opone al creado por la luz incidente con lo cual nos encontramos ante un caso de interferencia destructiva. (Dynich and Ponyavina 2008) Por otra parte, en otras regiones el resultado de la interferencia es constructiva, induciendo un scattering de la luz. Este mecanismo explica cualitativamente la gran sección eficaz de extinción que presentan los metales al ser excitados a la frecuencia de su SPR. (García 2011)

De entre los metales nobles, el oro tiene una estabilidad química mucho mayor que la plata o el cobre, por tanto, en general, se utilizan nanopartículas de este metal en aplicaciones biomédicas por su ser mucho más inerte.

3.2. Mecanismos de calentamiento de nanopartículas metálicas.

Al iluminar con luz una nanopartícula algunos de los fotones incidentes serán esparcidos por la nanopartícula mientras que otros serán absorbidos. Los fotones absorbidos son responsables de la producción de calor y luminiscencia. Este balance de energía se representa esquemáticamente en la **Figura 20**.

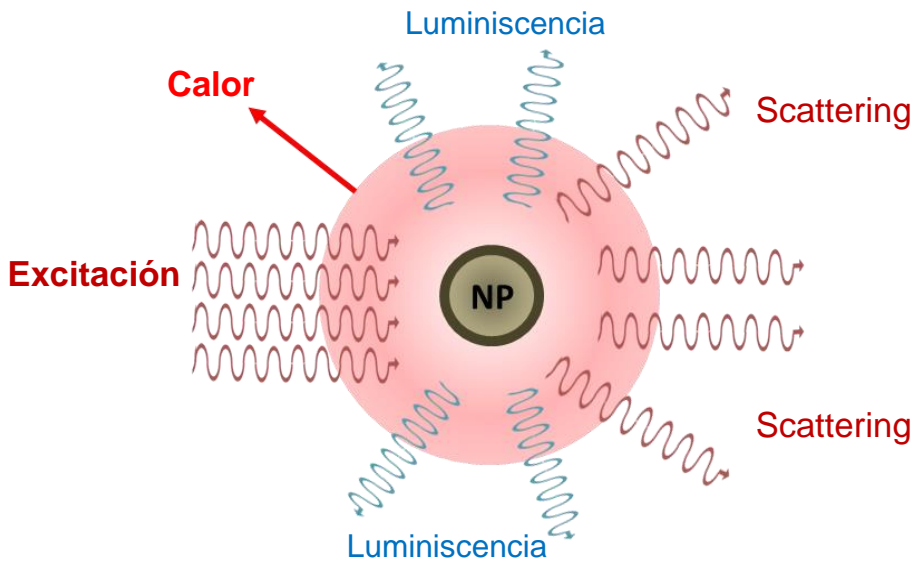


Figura 20. Representación esquemática de los diferentes procesos activados cuando la luz interacciona con una nanopartícula. La presencia de scattering, luminiscencia y generación de calor están incluidas. La generación de calor y de luminiscencia ocurre como consecuencia de la absorción de la luz.

El número total de fotones que interactúan con una nanopartícula viene dado por su coeficiente de extinción (α_{ext}), el cual se define a partir de la sección eficaz de absorción (σ_{ext}) y la concentración de nanopartículas (N) como:

$$\alpha_{ext} = N\sigma_{ext} \quad (13)$$

El coeficiente de extinción viene dado por la suma de los coeficientes de absorción y scattering de tal manera que:

$$\alpha_{ext} = \alpha_{abs} + \alpha_{sct} \quad (14)$$

La eficiencia de absorción, ϕ_{abs} , de una nanopartícula dada se define tradicionalmente como el número de fotones absorbidos dividido entre el número total de fotones incidentes interactuando con la nanopartícula, de tal manera que:

$$\phi_{abs} = \frac{\alpha_{abs}}{\alpha_{ext}} \quad (15)$$

La energía absorbida por la nanopartícula puede ser disipada mediante emisión de fotones a diferente energía que la de los fotones incidentes (luminiscencia) o mediante la generación de calor (procesos no radiativos). Ambos procesos se encuentran mostrados en la **Figura 20**. A nivel microscópico, la mayor parte del calor producido se debe a que los electrones libres se mueven y chocan constantemente de tal manera que el calor se genera por la relajación de estas corrientes superficiales (efecto Joule). La luminiscencia de los metales es casi nula, por lo que toda la luz absorbida se transforma en calor.

El calor que se produce al iluminar un metal es un efecto ampliamente conocido en la vida cotidiana. Para materiales en volumen este efecto es prácticamente independiente de la longitud de onda en el rango visible y no depende ni del tamaño ni la forma del cristal. Sin embargo, cuando nos movemos a la escala nanométrica, la situación se complica y, a pesar de que el calentamiento continúa presente, se convierte en fuertemente dependiente tanto de la longitud de onda como en la forma y tamaño de la nanopartícula. Es un hecho que las propiedades de las nanopartículas metálicas están fuertemente influenciadas por su tamaño, forma y entorno en el que se encuentran. Para entenderlo fácilmente, es muy ilustrativo examinar el espectro del coeficiente de extinción de nanopartículas esféricas tal y como se muestra en la **Figura 21**. Se puede ver que el pico del coeficiente de extinción se desplaza hacia el rojo según se aumenta el tamaño de la nanopartícula. Este efecto es una clara prueba del importante papel que juega el tamaño en la determinación de las propiedades ópticas de las nanopartículas metálicas.

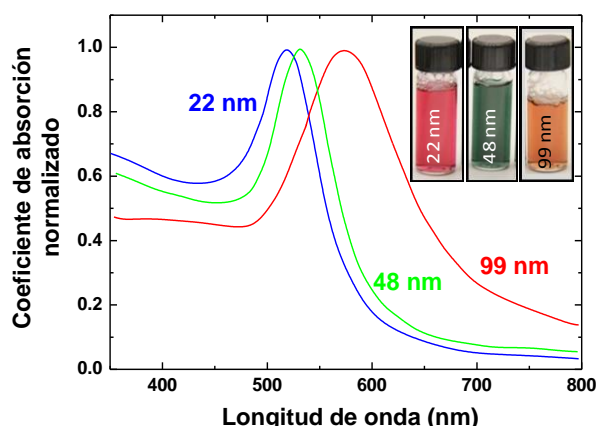


Figura 21. Coeficientes de absorción normalizados de tres soluciones acuosas que contienen nanopartículas de oro de diferentes diámetros. (Link and El-Sayed 2000)

Si centramos nuestra atención en las nanopartícula de 22 nm de diámetro podemos ver como su espectro de extinción está dominado por una banda ancha cuyo máximo se encuentra en 510 nm, lo cual confiere el típico color púrpura de las soluciones que contienen pequeñas nanopartículas de oro (como se puede ver en la fotografía de la **Figura 21**). Sin embargo, vemos como, al variar el diámetro de las nanopartículas, el color de las dispersiones que las contienen varía, como consecuentemente, el espectro de extinción de las mismas.

Para el propósito de la aplicación de cualquier tipo de nanopartículas como generadores de calor tras ser excitados con luz, es muy importante que la energía relajada por las nanopartículas mediante la generación de luminiscencia sea mínima para que toda la energía se disperse al medio en forma de calor. A pesar de que las nanopartículas metálicas han sido ampliamente utilizadas como marcadores luminiscentes bajo excitación multifotónica, su eficiencia cuántica está por debajo del 1%, lo cual quiere decir que se puede asumir que toda la energía absorbida se transforma en calor. (Jaque Garcia et al. 2014) Bajo esta asunción, la eficiencia de conversión de la luz en calor vendrá determinada por la contribución relativa de la sección eficaz de absorción a la sección eficaz de extinción. En este contexto, la eficiencia de calentamiento ($\phi_{\text{calentamiento}}$, definida como la fracción de energía de extinción que se transforma en calor) de nanopartículas de oro estará dada por la eficiencia de absorción. Así que podremos escribir:

$$\phi_{abs} = \phi_{calentamiento} = \frac{\alpha_{abs}}{\alpha_{ext}} = \frac{\sigma_{abs}}{\sigma_{ext}} \quad (16)$$

De acuerdo con la ecuación anterior, las nanopartículas metálicas con ratios de $\frac{\alpha_{abs}}{\alpha_{ext}}$ cercanos a la unidad serán deseables para una terapia fototérmica efectiva. Las contribuciones relativas de los procesos de scattering y absorción a la sección eficaz de extinción son difíciles de predecir a priori y requieren su estimación por métodos de simulación avanzados. En la **Figura 22** se pueden ver los cálculos de las contribuciones de secciones eficaces de absorción y scattering a la sección eficaz de extinción para diferentes geometrías de nanopartículas de oro. En la parte (a) de la figura se puede ver como para nanobastoncillos de oro (15 x 45 nm) se predice una eficiencia de absorción cercana al 98%, con lo que casi todos los fotones de 800 nm (máximo de extinción) interactuantes con la nanopartícula serían absorbidos. Sin embargo, otro tipo de geometrías, como las nano cáscaras de oro que se ven en la **Figura 22 (b)**, presentan una eficiencia de absorción menor, del 60 % en el máximo de absorción.

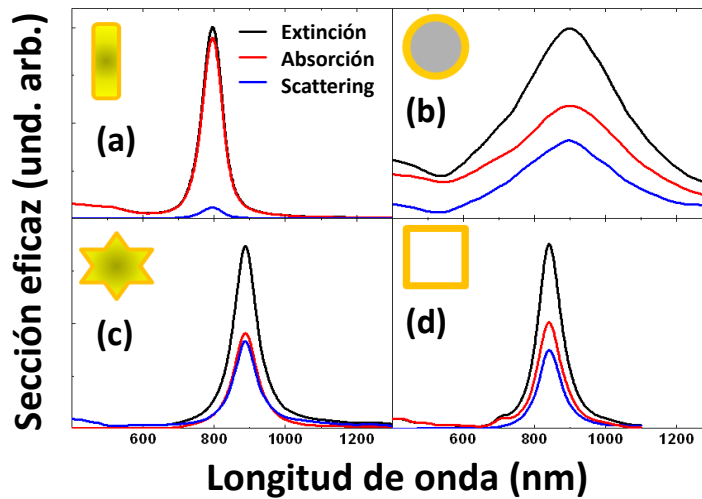


Figura 22. Secciones eficaces de extinción, absorción y scattering calculadas para: (a) nano bastoncillos de oro (gold nanorods, GNRs 15 nm de ancho y 45 nm de largo), (b) nano cáscaras de oro (gold nanoshells, GNSs, núcleo de sílicio de 60 nm de radio con una cáscara de oro de 10 nm de espesor), (c) nanoestrellas de oro (gold nanostars, GNSts, 32 nm de radio efectivo y 6 puntas) y (d) nano dados de oro (gold nanocages, GNCs, 5 nm de espesor de pared y 50 nm de largo de arista). Datos extraídos de (Jaque Garcia et al. 2014)

El desarrollo de los métodos de síntesis permite también la fabricación de nanopartículas de oro de geometrías más complicadas, como las nanoestrellas de oro (que se pueden ver en la **Figura 22 (c)**), o los nano dados de oro (**Figura 22 (d)**) en los cuales tan sólo hay oro en la superficie.

Recientemente, nuevos tipos de nanoestructuras metálicas se han propuesto para conseguir absorción en la primera y segunda ventanas biológicas. Al ser el espectro de extinción de estas nanopartículas tan dependiente de su geometría y tamaño, este es un reto altamente complicado. De hecho, una banda de absorción ancha requiere la combinación de múltiples geometrías en una sola nanopartícula. La solución a este problema encontrada por el grupo de Tsai (Tsai et al. 2013) es altamente interesante. Un esquema se puede ver en la **Figura 23**. Estos autores sintetizaron nanopartículas compuestas empezando por bastoncillos de oro con una longitud de onda de SPR cercana a 800 nm recubierta de una capa de plata de 2 a 7 nm de espesor. La presencia de esta fina capa de plata extiende el coeficiente de extinción de la nanopartícula a la parte visible del espectro (ver **Figura 23**).

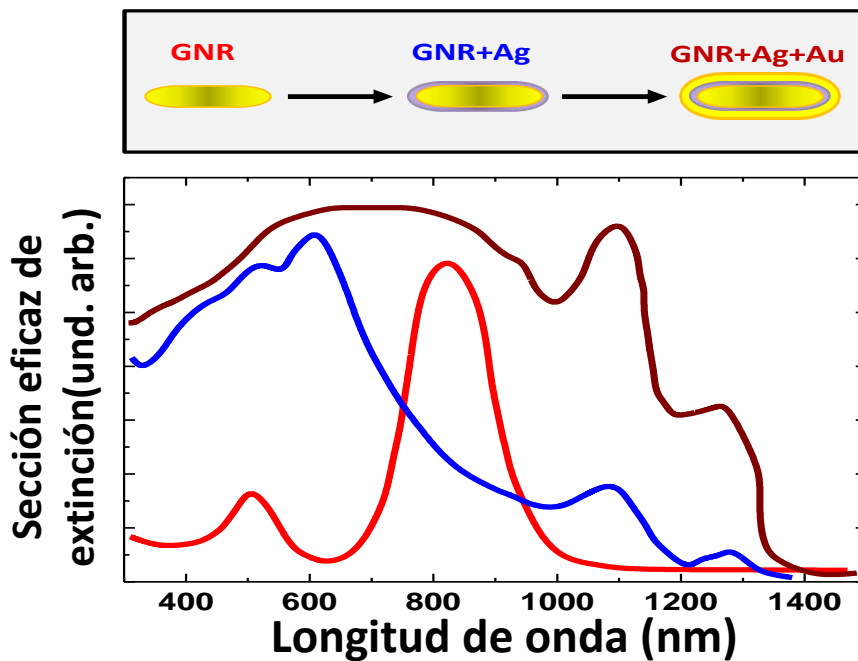


Figura 23. La fila de arriba muestra una representación de una nanopartícula metálica mixta para conseguir absorción en ambas ventanas biológicas. GNRs es la abreviatura de nano bastoncillos de oro. La gráfica de abajo muestra el espectro de extinción de la nanopartícula sintetizada en las tres etapas de la fabricación. (Tsai et al. 2013)

Para conseguir extender el espectro de excitación a la segunda ventana biológica (1-1.4 μm) la nanoestructura se recubre finalmente con una fina capa, de 4 nm de espesor, de oro. Con ello, como se puede ver en la **Figura 23**, se consigue extender la absorción de la luz a un rango espectral mucho más amplio.

3.3. Nanoestructuras de carbono.

Como en el caso de los metales, el calentamiento inducido bajo excitación con luz es un efecto bien conocido para otros tipos de nanopartículas, con numerosos ejemplos y aplicaciones. Durante los últimos años y debido al rápido desarrollo de métodos de síntesis, un gran número de materiales basados en carbón han sido desarrollados. Debido a su biocompatibilidad intrínseca por estar compuestos de carbono, este tipo de materiales han sido considerados como unos grandes candidatos para ser utilizados en aplicaciones biológicas.

Las nanoestructuras basadas en el carbono se pueden dividir en dos grandes grupos: nanodiamantes y nanoestructuras relacionadas con el grafito. Sin embargo, y para el propósito de utilizar estas nanopartículas en terapia fototérmica, hay que tener en cuenta que los nanodiamantes no han mostrado tener una gran eficiencia de conversión de la luz en calor. Por tanto, y debido a que las nanoestructuras relacionadas con el grafito han demostrado ser mucho más eficientes en la conversión de luz en calor, serán las que se discutan en este apartado.

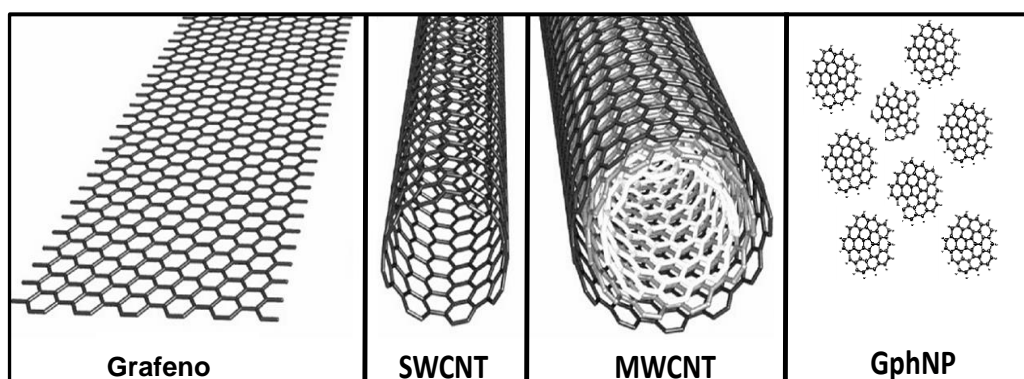


Figura 24. Diagrama esquemático de las geometrías básicas basadas en carbono utilizadas en aplicaciones fototérmicas. (Levi-Polyachenko et al. 2009)

La estructura más simple basada en el grafito es el grafeno, que consiste, simplemente, en una lámina bidimensional de grafito (ver **Figura 24**). Sin embargo las estructuras más desarrolladas son los nanotubos de carbono (CNTs). Estas estructuras, descubiertas por Iijima et al en 1991 son cilindros compuestos por láminas de grafeno enrollados en la forma de tubos cuyos diámetros característicos están en el rango de los pocos nanómetros y sus longitudes pueden

ir desde unas decenas de nanómetros hasta unas pocas micras. Las láminas de grafeno pueden enrollarse formando distintos ángulos y curvaturas, con lo cual se pueden conseguir una gran variedad de CNTs con distintas propiedades mecánicas, eléctricas u ópticas. De hecho, pequeños cambios en la geometría de cada nanotubo puede conllevar diferencias muy grandes en su estructura electrónica. La estructura de cada CNT está determinada por su diámetro y la orientación de los hexágonos del grafeno con respecto al eje del nanotubo. Generando distintas orientaciones se pueden tener CNTs con carácter metálico o semiconductor. En general, en la síntesis de nanotubos de carbono se mezclan estas orientaciones dando lugar a soluciones coloidales de CNTs las cuales no pueden clasificarse como metálicas o semiconductoras, sino una mezcla de ambos tipos. Existen dos tipos de nanotubos de carbono: aquellos formados por estructuras de una sola pared de grafeno, los conocidos como nanotubos de carbono de una sola pared (SWCNTs, por sus siglas en inglés), y los formados por varias paredes, nanotubos de carbono de múltiples paredes (MWCNTs, por sus siglas en inglés). Las tecnologías existentes para la producción de SWCNTs son complicadas, haciendo mucho más fácil la producción en masa de MWCNTs. Ambas estructuras pueden verse en la **Figura 24**. Finalmente cabe destacar el uso de las nanopartículas de grafeno (GphNP), constituidas por una sola capa de grafeno y con un área de pocos nm^2 , con un gran coeficiente de absorción en el infrarrojo.(Sun et al. 2008, Robinson et al. 2011)

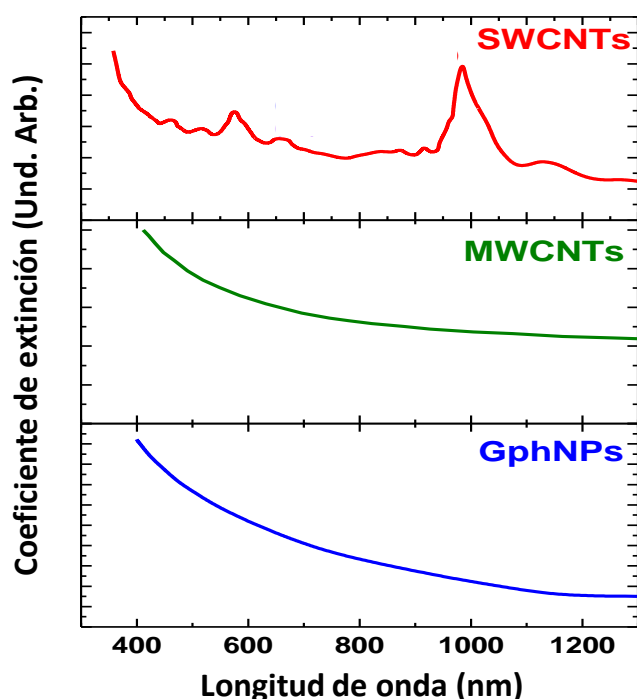


Figura 25. Espectros de extinción a temperatura ambiente para nanotubos de carbono de una sola pared (SWCNTs), nanotubos de carbono de múltiples paredes (MWCNTs) y nanopartículas de grafeno (GphNPs)(Sun et al. 2008, Robinson et al. 2011)

Los espectros de extinción típicos de las nanoestructuras de carbono utilizadas en terapia fototérmica se pueden ver en la **Figura 25**. En general, el espectro de extinción correspondiente a los SWCNTs consiste en varios picos de absorción superimpuestos a un fondo de absorción. Estos picos corresponden a diferentes transiciones entre singularidades de “Van Hove”. Cada uno de estos picos corresponde a una transición entre dos singularidades en la densidad de estados de un nanotubo que están directamente relacionadas con el diámetro del nanotubo y su orientación al enrollarse; es decir, con su carácter metálico. De hecho, este es uno de los métodos utilizados para estudiar el carácter metálico de los SWCNTs presentes en una solución. (Jaqu García et al. 2014)

El coeficiente de extinción correspondiente a los MWCNTs y GphNPs es similar pero más simple que el de los SWCNTs (ver **Figura 25**). Esencialmente consiste en un fondo de extinción que se extiende desde el visible al infrarrojo con un coeficiente de extinción que decrece monótonamente con la longitud de onda.

En estos casos, las transiciones “Van Hove” no se observan.(Jaque Garcia et al. 2014)

La conversión de luz en calor en los CNTs es debida a procesos de desexcitación entre estados de “Van Hove” que involucran luminiscencia y/o relajación no radiativa. En el caso de CNTs, la fluorescencia es eficientemente reducida por la interacción entre diferentes capas de carbono o entre las capas de carbono y otros materiales, tales como sustratos u otras nanopartículas. Por lo tanto resulta muy difícil producir una luminiscencia eficiente en nanotubos de carbono y, en general, sólo se observa en SWCNTs. Como consecuencia, y en especial para el caso de los MWCNTs, se puede asumir que toda la energía absorbida es transformada en calor.(Jaque Garcia et al. 2014)

4. Técnicas experimentales

Introducción.

En este capítulo se describen, primero, las nanopartículas utilizadas en la presente tesis, tanto sus esquemas geométricos como, en los casos en los que se disponía de tal información, sus métodos de síntesis y las moléculas que recubren su superficie. También se podrán ver imágenes de TEM de estas nanopartículas y estimaciones sobre el número de átomos por nanopartícula en los casos que ha sido posible realizar dicha estimación.

Tras ello, se procede a la descripción de los procedimientos experimentales utilizados en la caracterización óptica de las nanopartículas utilizadas en la presente tesis; tanto para la emisión y extinción de las muestras, como para las medidas de la eficiencia cuántica y del método experimental para determinar la eficiencia de calentamiento.

Después, se procederá a describir los montajes experimentales utilizados para la obtención de imágenes por fluorescencia: el microscopio confocal de fluorescencia, el microscopio multifotónico y el montaje experimental utilizado en la obtención de imágenes térmicas.

Por último se describirá el montaje experimental utilizado en los experimentos de terapia fototérmica *in vivo*.

4.1. Nanopartículas.

Para la realización de los experimentos recogidos en esta memoria de tesis se han utilizado diferentes tipos de nanopartículas inorgánicas, las cuales se detallarán a continuación.

Las imágenes de TEM presentadas en este apartado se realizaron en el servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa con un Microscopio Electrónico de Transmisión JEM 1010 (Jeol) acoplado a una cámara digital 4Kx4K TemCam-F416 (TVIPS).

4.1.1. Puntos cuánticos de semiconductor.

4.1.1.1. Puntos cuánticos de semiconductor con estructura núcleo-corteza

La estructura de núcleo-corteza (“core-shell” en inglés) consiste en encapsular el QD dentro de otro material semiconductor. Para la realización de la presente tesis doctoral se adquirieron CdSe-QDs con estructura “core-shell” de la casa comercial Invitrogen (Invitrogen Inc., ref Q21521MP), como se puede ver en la **Figura 26**, los cuales presentan un núcleo de CdSe (4 nm) rodeado de una capa de ZnS (1 nm) que a su vez está recubierta de un polímero, cuya composición está protegida bajo patente, y que posibilita su dispersión en solventes polares próticos, esto es, disolventes que tienen un átomo de hidrógeno unido a un oxígeno o un nitrógeno, como el agua. Ya que, debido a la naturaleza hidrofóbica del ZnS, se necesita un polímero que lo recubra y que logre formar puentes de hidrógeno con el agua y, por tanto, que la nanopartícula resultante sea dispersable en agua.

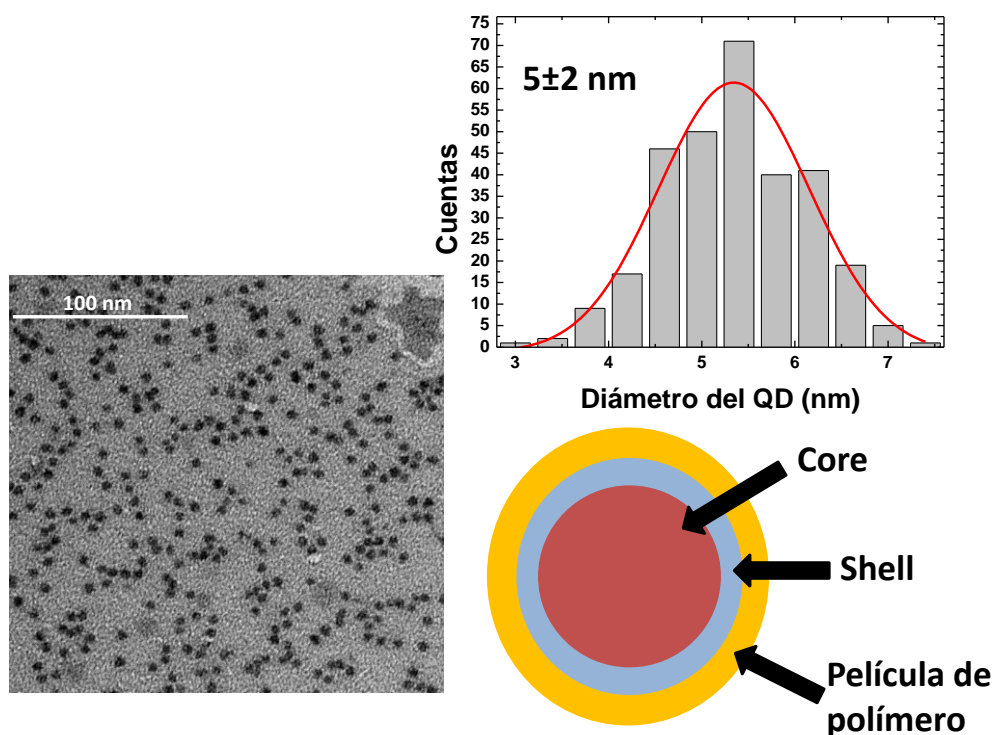


Figura 26. Histograma de tamaños, imagen de TEM y esquema de los CdSe-QDs utilizados en esta tesis.

La red cristalina del CdSe es una red cúbica centrada del siguiente tipo:

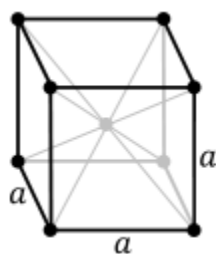


Figura 27. Esquema cristalino de una red cúbica centrada.

Como se puede ver en la **Figura 27**, cada celda unidad consta de nueve átomos. El parámetro de red es de $a=6.08 \text{ \AA}$, por lo tanto, el volumen de la celda unidad es de $a^3=2.25 \cdot 10^{-22} \text{ cm}^3$. Teniendo en cuenta que nuestros CdSe-QDs tienen un diámetro nominal de 4 nm, su volumen será de:

$$V_{\text{nanopartícula}} = \frac{4}{3} \pi \cdot r^3 = 3.3 \cdot 10^{-20} \text{ cm}^3, \text{ donde } r \text{ es el radio, } r=2 \text{ nm, de cada}$$

nanopartícula. Dividiendo el volumen de la nanopartícula entre el volumen de la celda unidad, tendremos el número de celdas unidades y, multiplicando este número por el de átomos en cada celda unidad, encontramos el número de átomos por nanopartícula, viniendo este dado por:

$$\text{Átomos por nanopartícula} = 9 \cdot \frac{V_{\text{nanopartícula}}}{V_{\text{celda unidad}}} = 1.34 \cdot 10^3$$

También podemos estimar el número de átomos superficiales que encontramos en nuestras nanopartículas. Para ello supongamos que los átomos que se encuentren en la superficie de la esfera formaran una corteza cuyo espesor vendrá dado por el parámetro de red. Por tanto, el volumen que ocuparán estos átomos será:

$$V_{\text{superficial}} = \frac{4}{3} \pi [R - a]^3 = \frac{4}{3} \pi [4 - 0.608]^3 = 163.477 \text{ nm}^3$$

Dividiendo el volumen superficial entre el volumen de la nanopartícula encontraremos el porcentaje de átomos superficiales:

$$\frac{V_{\text{superficial}}}{V_{\text{nanopartícula}}} = \frac{\frac{4}{3} \pi R^3 - \frac{4}{3} \pi [R - a]^3}{\frac{4}{3} \pi R^3} = \frac{R^3 - [R - a]^3}{R^3} = \frac{4^3 [4 - 0.608]^3}{4^3} = 0.39 \rightarrow 39\%$$

Es decir, que en nuestros CdSe-QDs, casi un 40% de los átomos pueden considerarse como “superficiales”. Esta característica explica una alta sensibilidad ante cambios en su entorno, como pueden ser los cambios en la temperatura, tal y como se comprobará en esta tesis.

4.1.1.2. Puntos cuánticos de semiconductor de estructura de núcleo sencillo.

Para este estudio disponíamos de ocho tipos de QDs de tamaños distintos, todos de CdTe suministrados por la casa Plasmachem, los cuales presentan una estructura que consta de un núcleo de CdTe rodeado, directamente, de moléculas orgánicas, entre ellas se encuentra el ácido tricarbóxico. Gracias a estas

moléculas las nanopartículas son dispersables en agua. Un esquema de estas nanopartículas se puede ver en la **Figura 28**.

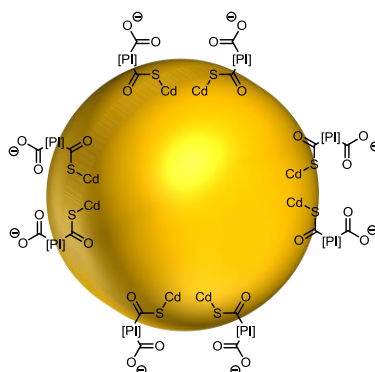
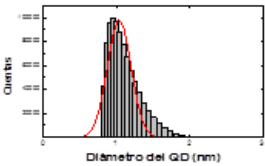
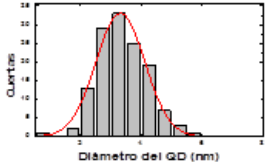
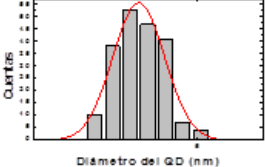
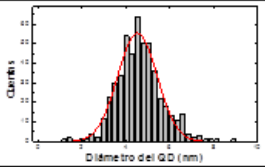
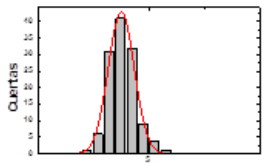
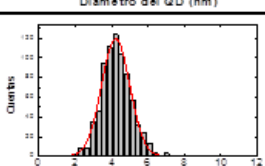
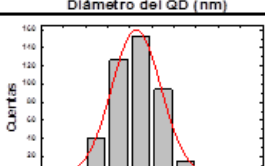


Figura 28. Esquema de los CdTe-QDs utilizados en esta tesis

Como en el caso de los CdSe-QDs se tomaron imágenes de TEM de las distintas muestras de CdTe-QDs para el cálculo del tamaño, número de átomos por nanopartícula y porcentaje de átomos superficiales presentes en estos QDs, teniendo en cuenta que el CdTe presenta una red cristalina cúbica centrada, con un parámetro de red de 6.4 Å. Todos estos datos se pueden ver resumidos en la **Tabla 2**. Llama la atención la gran diferencia encontrada entre el tamaño experimental y nominal de los CdTe-QDs que emiten a 780 nm, lo cual pone de relieve la necesidad de realizar una caracterización sistemática de todas las muestras comerciales.

Tabla 2. Tabla resumen CdTe-QDs utilizados en este trabajo

Histogramas	Diámetro experimental (nm)	Diámetro nominal (nm)	Emisión (nm)	Volumen nanopartícula (cm ³)	Átomos por nanopartícula	Porcentaje de átomos en superficie
	1.2±0.2	1.2	510	$9.02 \cdot 10^{-22}$	310	89.8
	3±1	2.3	540	$6.37 \cdot 10^{-22}$	219	62.4
	3±1	3.1	570	$1.56 \cdot 10^{-20}$	535	50.1
	4±2	3.6	630	$2.44 \cdot 10^{-20}$	838	44.4
	4±1	3.8	660	$2.87 \cdot 10^{-20}$	986	42.5
	4±1	4.7	710	$5.43 \cdot 10^{-20}$	1870	35.5
	5±2	7.3	780	$2.04 \cdot 10^{-19}$	6990	24.1

4.1.2. Nanopartículas de oro

En la presente tesis doctoral se utilizan diferentes nanopartículas de oro, todas ellas cuentan con distintos recubrimientos para hacerlas dispersables en solventes polares próticos. Estos recubrimientos consisten en moléculas que presentan cabezas hidrofílicas que encapsulan a las nanopartículas dejando la parte hidrofílica en contacto con el agua. Un esquema general de este tipo de estructura se puede observar en la **Figura 29**.

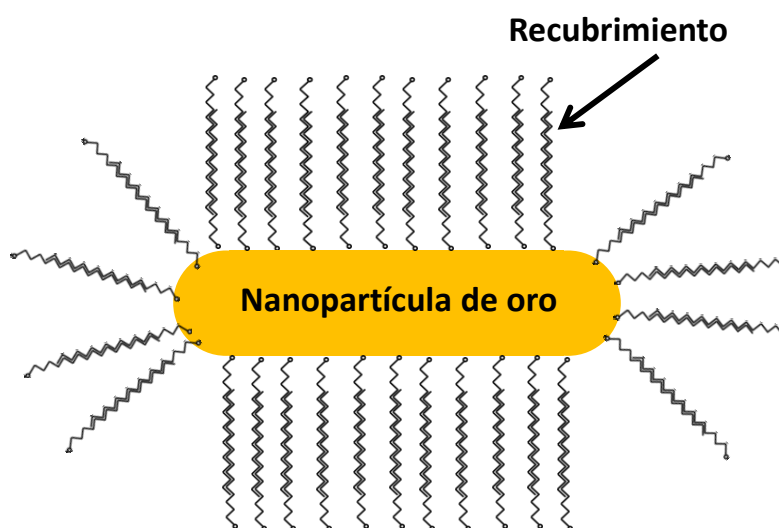


Figura 29. Esquema general de las nanopartículas de oro (en este caso dibujamos un nanobastoncillo) utilizadas en la presente tesis.

Para la presente tesis disponíamos de diferentes morfologías; nano cáscaras de oro (gold nanoshells, GNSs), nano bastoncillos de oro (gold nanorods, GNRs), nano dados de oro (gold nanocages, GNCs) y nanoestrellas de oro (gold nanostars, GNSts); estas últimas se dividen dependiendo de la longitud de sus brazos, en cortas (GNSts-s) y largas (GNSts-l). En la **Figura 30** podemos observar unas imágenes de TEM de las nanopartículas anteriormente mencionadas en la que se puede apreciar claramente las distintas morfologías. En la misma figura también se encuentra una imagen óptica de las distintas dispersiones acuosas de nanopartículas quedando claro el carácter coloidal de todas ellas (no aprecian agregados).

A continuación pasamos a describir en detalle las diferentes morfologías de nanopartículas de oro de las que disponíamos.

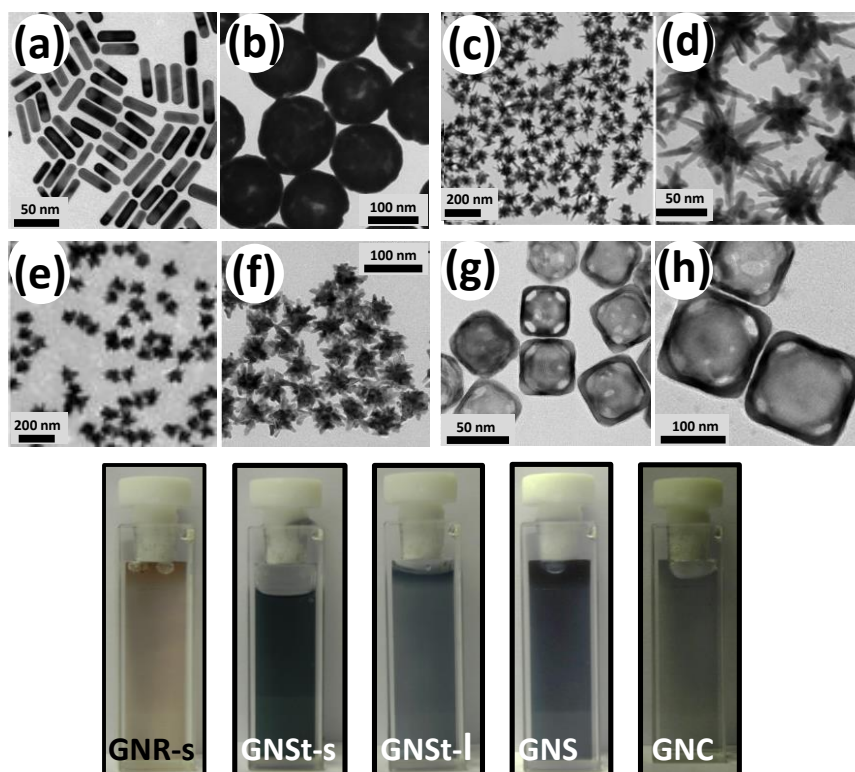


Figura 30. Imágenes de TEM de las cinco geometrías estudiadas en la presente tesis: (a) nanobastoncillos de oro (GNRs), (b) nanocáscaras de oro (GNSs), (c,d) nanoestrellas de oro largas (GNSt-l), (e,f) nanoestrellas de oro cortas (GNSt-s) y (g,h) nanodados de oro (GNCs). En la parte de debajo de la figura se puede ver una imagen óptica de las dispersiones acuosas de las diferentes nanopartículas citadas. La dispersión de GNRs corresponde a GNRs-s de Nanorods.

4.1.2.1. Nanobastoncillos de oro (GNRs)

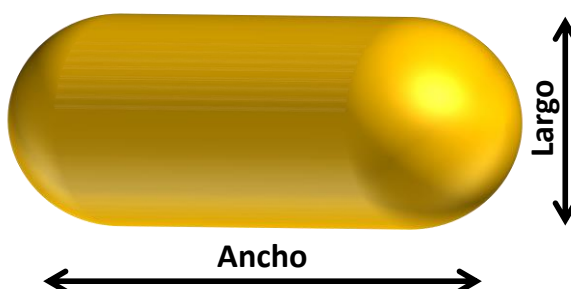


Figura 31. Esquema geométrico de un nanobastoncillo de oro (GNR)

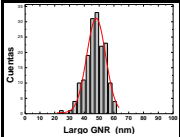
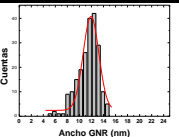
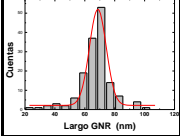
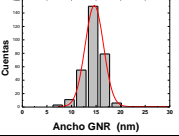
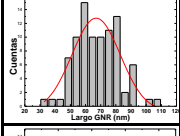
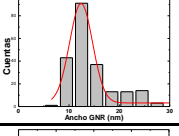
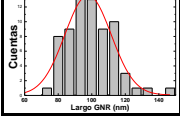
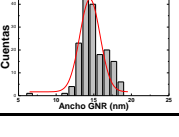
Los nanobastoncillos de oro (GNRs) utilizados en la presente tesis fueron suministrados por dos casas comerciales diferentes, con lo que constan de dos recubrimientos superficiales distintos. Su esquema geométrico se puede ver en la **Figura 31**. La relación entre el ancho y el largo recibe el nombre de relación de aspecto (conocido como “aspect ratio” en inglés) y es un parámetro de gran importancia, ya que se ha demostrado que determina las propiedades ópticas de los GNRs.

4.1.2.1.1. *Nanobastoncillos de oro suministrados por la casa Nanopartz.*

En el caso de los GNRs suministrados por Nanopartz estaban recubiertos por una bicapa molecular con una cabeza polar orientada hacia los GNRs y la otra cabeza hacia la solución acuosa. Las colas no polares se encuentran orientados hacia el interior de la estructura. No se tienen más datos sobre este compuesto ni sobre el método de síntesis al ser propiedad intelectual de la compañía.

Disponíamos de cuatro muestras diferentes de GNRs, cuyos tamaños fueron determinados mediante el análisis de imágenes de TEM. Se ha calculado el número de átomos por nanopartícula presentes en los GNRs de Nanopartz, teniendo en cuenta que el oro presenta una red cúbica centrada con parámetro de red de 4.7 Å. Los datos de tamaño y número de átomos de oro se resumen en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Tabla resumen GNRs de Nanopartz utilizados en este trabajo.

Histograma Largo	Histograma Ancho	Ancho (nm)	Largo (nm)	Máximo Extinción (nm)	Volumen nanopartícula (cm ³)	Átomos por nanopartícula
		11.9±0.1	48.1±0.4	808	5.36·10 ⁻¹⁸	51500
		14.64±0.03	68.7±0.4	900	1.16·10 ⁻¹⁷	111330
		12.4±0.2	66±2	980	7.91·10 ⁻¹⁸	76729
		14.9±0.2	97±1	1090	1.69·10 ⁻¹⁸	162824

4.1.2.1.2. Nanobastoncillos de oro suministrados por la casa Nanorods.

En el caso de los GNRs suministrados por la casa Nanorods, estaban recubiertos por una capa de bromuro de cetiltrimetilamonio (conocido como CTAB), el cual forma micelas que encapsulan a los GNRs, lo cual hace posible su dispersión en agua.

Para este estudio disponíamos de dos muestras de GNRs con distintos tamaños los cuales fueron caracterizados mediante TEM. Se nombraron estas dos muestras como nanobastoncillos cortos, GNRs-s, y nanobastoncillos largos, GNRs-l. En la **Figura 32** se pueden ver los tamaños promedios para el ancho (a) y el largo (b) de los nanobastoncillos de oro largos, GNRs-l, y el ancho (c) y largo (d) de los nanobastoncillos de oro cortos, GNRs-s, así como la relación entre ancho y largo (e), que, en este tipo de nanorods (**Figura 32 (e)**), se mantiene constante.

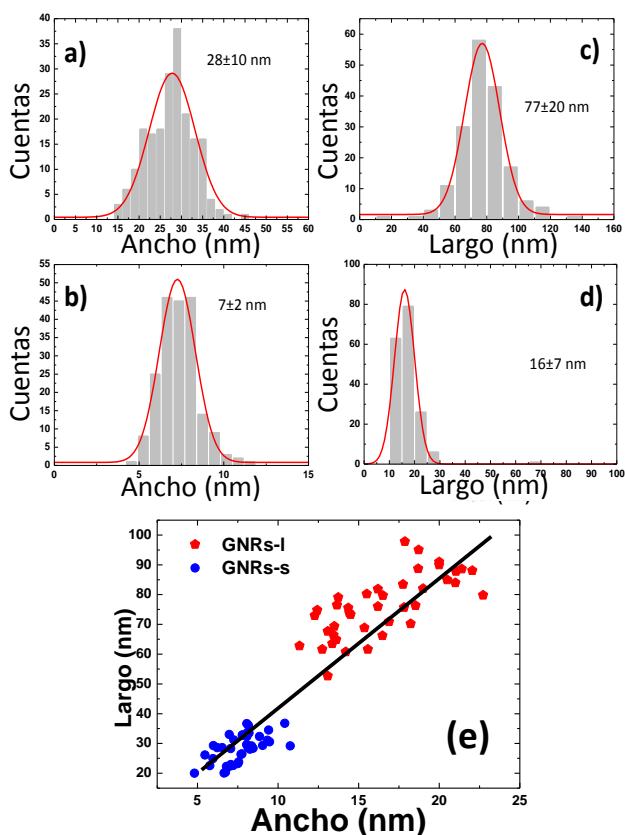


Figura 32. (a,b,c,d) Histogramas de los GNRs de Nanorods obtenidos a partir de imágenes de TEM. (e) relación de ancho frente a largo (“aspect ratio”) para GNRs-s y GNRs-I.

Para este tipo de GNRs también se ha calculado tanto el volumen como el número de átomos por nanopartícula, valores que se encuentran en la **Tabla 4**.

Tabla 4 Tabla resumen GNRs de Nanorods utilizados en este trabajo.

Tipo de nanopartícula	Largo (nm)	Ancho (nm)	λ_{SPR} (nm)	Volumen nanopartícula (cm^3)	Átomos por nanopartícula
GNRs-s	16 ± 7	7 ± 2	808	$1.07 \cdot 10^{-18}$	10373
GNRs-I	77 ± 20	28 ± 10	1020	$1.55 \cdot 10^{-27}$	149041

4.1.2.2. Nanocáscaras de oro (GNSs)

Las nanocáscaras de oro utilizadas en esta tesis fueron suministradas por la casa comercial Nanocomposix y se componen por un núcleo de sílice de 120 ± 5 nm

de diámetro rodeado de una capa de oro de 10 ± 1 nm de espesor. Alrededor del oro se encuentra una capa de polietilenglicol (PEG) para hacer las nanopartículas dispersables en agua, como se puede ver en la **Figura 33**. Estas nanopartículas tienen un volumen $4.70 \times 10^{-16} \text{ cm}^3$ y constan de 4.07×10^7 átomos por nanopartícula.

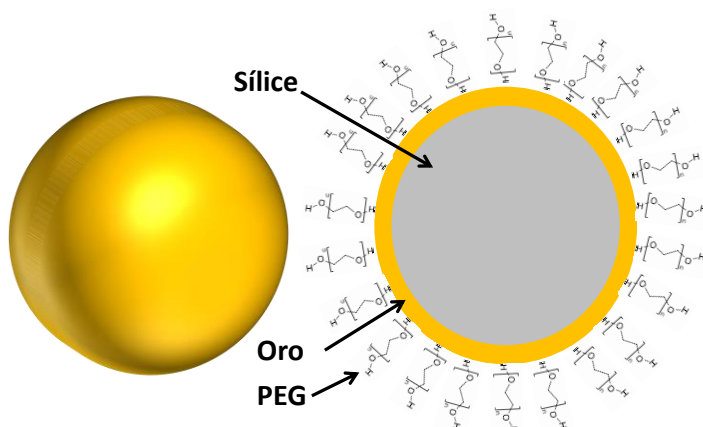


Figura 33. Esquema geométrico de una nanocáscara de oro (GNS)

4.1.2.3. Nanodados de oro (GNCs)

Los nanodados de oro utilizados en este trabajo fueron sintetizados por el grupo del profesor Luis Liz-Marzán, de CIC biomaGUNE, mediante síntesis de polioles seguido de remplazamiento galvánico. En este caso el recubrimiento que hace que estas nanopartículas sean estables en dispersiones acuosas es el polivinilpirrolidona (abreviado povidona o PVP). Los GNCs tienen una morfología cúbica, como se puede ver en la **Figura 34** con una arista de 47 ± 3 nm de longitud y un espesor de arista de 4 ± 1 nm. De esta manera el volumen de las nanopartículas es de $3.98 \times 10^{-21} \text{ cm}^3$ y el número de átomos de oro por nanopartícula de 345.

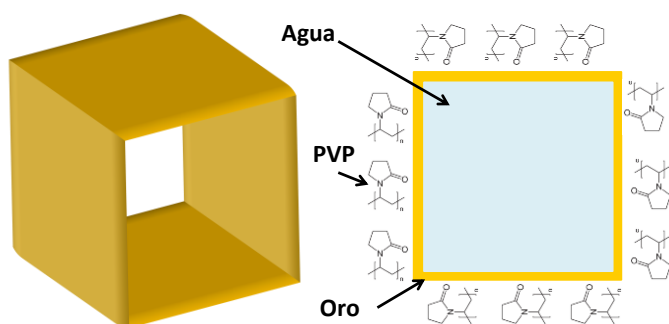


Figura 34 Esquema geométrico de un nanodado de oro (GCS)

4.1.2.4. Nanoestrellas de oro (GNSts).

En la presente tesis se estudiaron dos tipos de nanoestrellas de oro, ambas sintetizadas por el grupo del profesor Luis Liz-Marzán con una capa de bromuro de cetiltrimetilamonio, CTAB, para asegurar su estabilidad coloidal en dispersión acuosa. Las propiedades de las nanoestrellas de oro dependen fuertemente de su geometría por lo que se estudiaron dos tipos de nanoestrellas de oro: de lóbulos cortos (GNSts-s) y nanoestrellas de oro de lóbulos largos (GNSts-l).

4.1.2.4.1. Nanoestrellas de oro de lóbulos cortos (GNSts-s)

Este tipo de nanopartícula consta en un núcleo central con forma esférica de 36 ± 4 nm de diámetro rodeado de unos lóbulos de 6 ± 3 nm de diámetro en la base y 13 ± 3 nm de largo. El número de lóbulos en este tipo de nanoestrellas es, de media, 10. Para este tipo de nanopartículas hemos estimado un volumen de $5.44 \times 10^{-17} \text{ cm}^3$ y, por tanto, un número de átomos de oro por nanopartícula de 4.72×10^6 . Un esquema geométrico de las GNSts-s puede verse en la **Figura 35**. La síntesis de este tipo de nanopartícula consiste en la mezcla de una solución acuosa de HAuCl_4 (50mM, 0.08 mL) con polivinilpirrolidona (PVP) (10 mM, 15 mL) en N,N-dimetilformamida (DMF), seguido rápidamente por una adición de semillas de oro recubiertas de PVP preformadas dispersas en etanol ($[\text{Au}] = 4.2$ mM, 13 ± 2 nm, 0.04 mL). Esta mezcla se agita durante 15 minutos mientras va pasando por los colores rosa, incoloro, y por último azul, lo cual indica la formación de nanoestrellas.

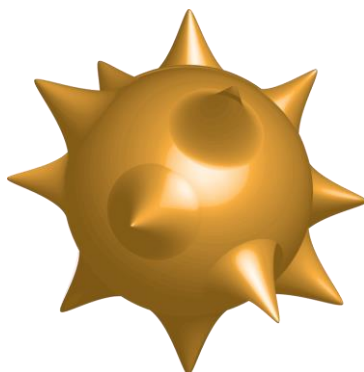


Figura 35. Esquema geométrico de una GNSt-s.

4.1.2.4.2. Nanoestrellas de oro de lóbulos largos (GNSts-l)

Este tipo de nanopartícula consta en un núcleo central con forma esférica de 38 ± 4 nm de diámetro rodeado de unos lóbulos de 9 ± 3 nm de diámetro en la base y 46 ± 6 nm de largo. El número de lóbulos en este tipo de nanoestrellas es, de media, 17. Un esquema geométrico de las GNSts-s puede verse en la **Figura 36**. La síntesis de estas nanopartículas se consigue añadiendo una solución de semillas de oro ($[\text{Au}] = 0.5$ mM, 13 ± 2 nm, 0.75 mL) a una mezcla de HAuCl_4 (0.25mM, 50mL) con HCl (1M, 0.05 mL) a temperatura ambiente. La mezcla es agitada y se le añade nitrato de plata (10 mM, 0.15 mL) y ácido ascórbico (100 mM, 0.25 mL) al mismo tiempo. Cuando la solución cambie de color del rojo al azul, se le añade CTAB (15mM, 50mL) para asegurar la estabilidad coloidal de las nanopartículas.

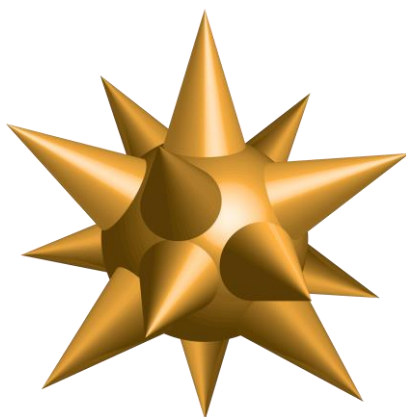


Figura 36. Esquema geométrico de una GNSt-l.

4.1.3. Nanotubos de carbono.

En esta tesis doctoral se han utilizado nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNTs), que fueron suministrados por la casa comercial Plasmachem. Presentan unos diámetros de 2-6 nm en la cara interior y unas longitudes de 1-10 μm . Su superficie se encuentra recubierta de grupos COOH para asegurarse su dispersión en solventes polares. La **Figura 37** incluye una imagen de TEM y óptica de una dispersión acuosa de la muestra.

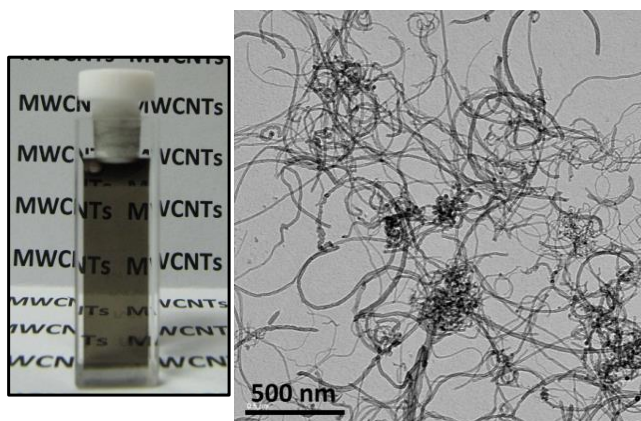


Figura 37. Imágenes de TEM de los MWCNTs, así como una imagen óptica de una disolución de los mismos en agua.

4.2. Caracterización óptica de las Nanopartículas

4.2.1. Espectroscopia básica.

4.2.1.1. Extinción.

Los espectros de extinción se obtuvieron mediante un espectrofotómetro de doble haz, Perkin Elmer Lambda 1050, que se encuentra equipado con un fotomultiplicador para la detección espectral en el rango de 200 a 860 nm, un detector de InGaAs refrigerado por efecto Peltier para el rango de 860 a 1800 nm y un detector de PbS refrigerado para el rango de 1800 a 3300 nm. La resolución de este espectrómetro es de 0.2 nm.

4.2.1.2. Emisión.

Las medidas de fotoluminiscencia se realizaron en un microscopio confocal, como el que se muestra en la **Figura 43** y que se discutirá en la **sección 4.3.1**.

Como fuente de excitación se utilizaron distintos láseres dependiendo del experimento:

- Ti: Zafiro (Spectra Physics 3900) bombeado por un láser continuo de argón trabajando en régimen multilínea de 20 W de potencia máxima (Spectra Physics 2040). El láser de Ti: Zafiro es sintonizable en el rango espectral comprendido entre 710 y 950 nm y posee un ancho de banda inferior a 40 GHz (~ 0.1 nm). El haz de salida presenta un modo gaussiano (TEM_{00}) y polarización lineal.
- Ti:Zafiro (Tsunami, Spectra Physics) bombeado por un láser de Nd:YVO₄ doblado operando a 532 nm (Millenia, Spectra Physics) con una potencia de 5W. El láser de Ti:Zafiro (que trabaja en modo de ajuste de modos “mode locking”) es sintonizable en el rango espectral comprendido entre 700 y 1000 nm en régimen pulsado con una anchura de 10-15 nm para un pulso de 100 fs. La energía por pulso es de 8 nJ, con 350 kW de potencia por pico y una frecuencia de repetición de 80 MHz.

- Láser de diodo con longitud de onda en torno a 980 nm, ligeramente sintonizable con la temperatura, de la marca LIMO. Acoplado a fibra multimodo.
- Láser de diodo con longitud de onda en torno a 810 nm, ligeramente sintonizable con la temperatura, de la marca LIMO. Acoplado a fibra multimodo.
- Láser de diodo con longitud de onda en torno a 1090 nm, de la marca Red Power.
- Láser de argón emitiendo a 488 nm (Spectra Physics).
- Láser de Nitrógeno (337 nm), spectra physics 337201-01. Energía por pulso de 300 μ J con potencia por pico de 75 kW y una frecuencia de repetición de 20 Hz
- Láser de He-Ne a 632 nm.

Como sistema de detección se usó un monocromador (SPEX 500M) con una red de difracción de 1200 rendijas/mm con máxima eficiencia de difracción (“blaze”) a 750 nm. El conjunto presenta una resolución máxima (rendija a 1 μ m) de 0.02 nm y una dispersión de 1.6 nm/mm. Según el experimento, se usaron los siguientes detectores:

- Un dispositivo de carga acoplada de silicio (Synapse CCD, de la marca Horiba Jobin Yvon) refrigerado por efecto Peltier a -70°C para los experimentos de emisión para medidas de espectros de emisión en el rango 400-1100 nm.
- un fotomultiplicador de InGaAs (modelo R2658 de la marca Hamamatsu) enfriado por peltier a -70°C para medidas de tiempos de vida media.

Las medidas del tiempo de decaimiento de la luminiscencia se hicieron utilizando un montaje como el de la **Figura 38** . Como fuente de excitación se utilizó el láser de nitrógeno arriba indicado. La señal se detectó usando un fotomultiplicador de InGaAs (modelo R2658 de la marca Hamamatsu) enfriado por peltier a -70°C y se procesó mediante un osciloscopio digital (modelo Waverunner LT372 de la marca Lecroy con un ancho de banda de 500MHz). El nivel de trigger

se ajustó usando como referencia la señal de entrada del láser de excitación. Como se puede ver en la **Figura 38**, el haz de excitación se focalizó sobre la muestra usando una lente con distancia focal de 15 cm. La luminiscencia se recogió en configuración perpendicular al haz de incidencia mediante una lente con distancia focal de 5 cm, para posteriormente ser focalizada en el sistema de detección con otra lente con distancia focal de 15 cm.

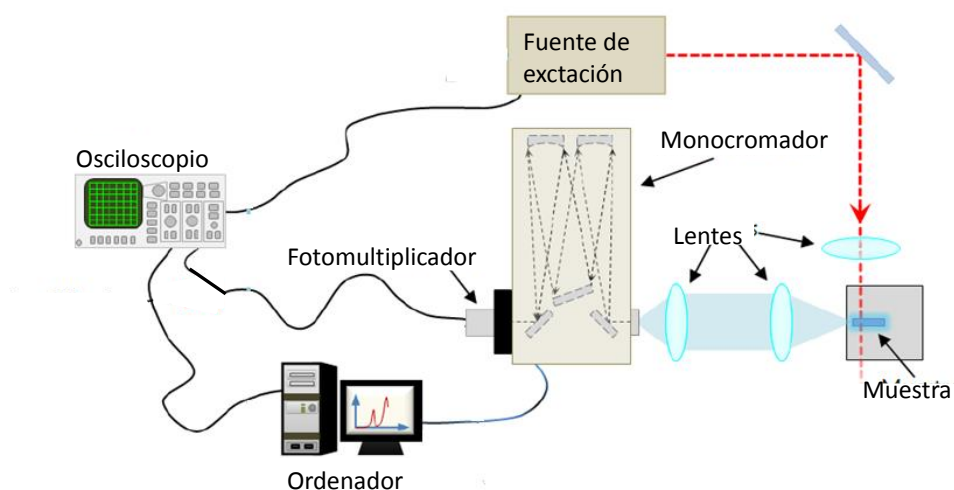


Figura 38. Montaje utilizado para la medida de las vidas medias.

4.2.2. Eficiencia cuántica. El método de la lente térmica.

El efecto de “lente térmica” (LT) es un efecto fototérmico producido por la absorción local e inhomogénea de un haz láser gaussiano que atraviesa una muestra. La lente se crea por la dependencia con la temperatura del índice de refracción. Al ser el haz más intenso en la zona central, se crea un gradiente de temperatura, ya que la zona central se encuentra a mayor temperatura. La lente creada térmicamente suele ser de distancia focal negativa, es decir, menor índice de refracción en la zona central. La aparición de esta lente de focal negativa puede detectarse mediante el análisis de la divergencia inducida en un segundo haz láser (haz de referencia) colineal con el haz láser parcialmente absorbido (haz de excitación).

La magnitud del calentamiento, y por tanto de la lente inducida, depende tanto del coeficiente de absorción de la muestra como de la potencia del láser de

excitación. Para un haz de perfil gaussiano, la variación espacial de la intensidad a través del haz es una función conocida. El calentamiento causado por la absorción de un haz gaussiano tiene simetría radial a lo largo del camino del haz en la muestra, lo cual corresponde a un gradiente de temperatura también radial a lo largo de la muestra.

Para la detección de la lente térmica creada se utiliza un segundo láser (haz de referencia) cuya intensidad en eje disminuye al atravesar la lente térmica. La variación de la intensidad del haz láser en eje que atraviesa la muestra durante la formación de la lente térmica se puede ver como inset en la **Figura 39**. El haz de referencia no es absorbido por la muestra, luego su intensidad total no cambia; sin embargo la lente térmica lo expande y hace que la intensidad en el eje disminuya.

El montaje experimental, como se puede apreciar en la **Figura 39**, está basado en un montaje con dos haces, uno que sirve como referencia y otro como excitación. En nuestro caso particular el láser de excitación era un láser de Argón a 488 nm (absorbido por los QDs) mientras que el láser de referencia era un láser de He-Ne a 632 nm. El haz de excitación pulsado genera un cambio gradual en la intensidad en eje del haz de referencia.

La señal del primer haz láser, el de excitación, está modulada de tal manera que en la muestra se induce la creación de una lente térmica dependiente del tiempo. Por tanto, la intensidad en eje del segundo haz láser, el de referencia, sufrirá una disminución dependiente también del tiempo, como se puede ver en la **Figura 39**.

En dicha **Figura 39** se puede ver un esquema geométrico que clarifica la posición de los haces de excitación y referencia donde también están marcados Z_1 (la distancia de la cintura del haz de prueba a la muestra), w_e (cintura del haz de excitación) y w_p (radio del haz de prueba en la muestra).

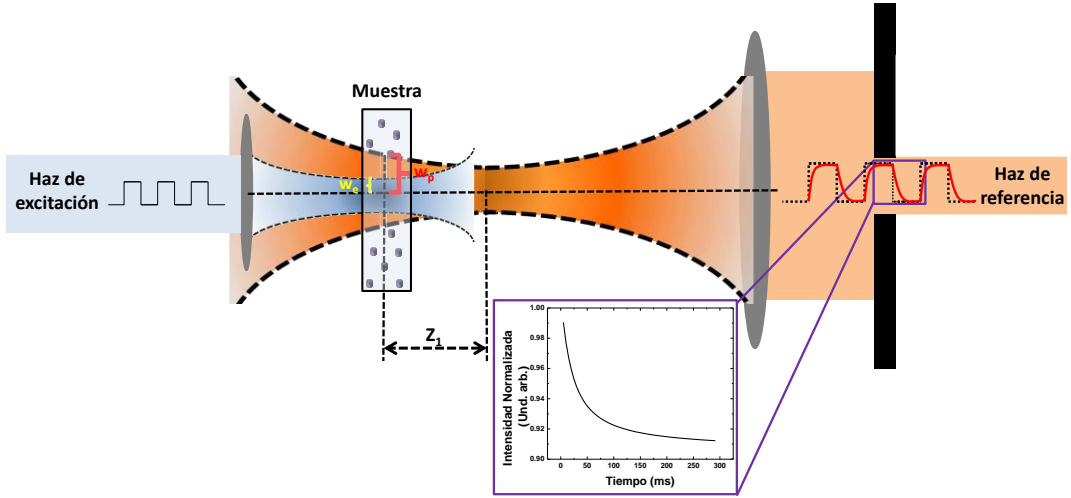


Figura 39. Esquema geométrico de la posición de los haces de excitación y referencia en el montaje experimental de la lente térmica. En inset podemos ver la evolución temporal del perfil de temperaturas inducido por láser en una muestra.

La evolución temporal de la temperatura, $\Delta T(r, t)$, dependiente del tiempo y de la posición radial, se escala de acuerdo a la constante de tiempo característico,

$$t_c = \frac{w_e^2}{4D} \quad (17)$$

Siendo w_e el radio del haz de excitación en la muestra (que se corresponde con la cintura del haz) y D la difusividad térmica de la muestra.

La propagación de un láser de referencia a través de la LT produce un cambio en la intensidad en eje de este haz. Dicha intensidad viene dada por:

$$I_{TL}(t) = I_{TL}(0) \left\{ 1 - \frac{\theta}{2} \arctan \left[\frac{2mV}{\left[(1+2m)^2 + V^2 \right] t_c / (2t + 1 + 2m + V^2)} \right] \right\}^2 \quad (18)$$

donde, $m = \left(\frac{w_p}{w_e} \right)^2$, $V = \frac{Z_1}{Z_c}$ (con $Z_c \ll Z_2$) y siendo Z_c la distancia focal del

haz de prueba, Z_1 recordamos que es la distancia de la cintura del haz de prueba a la muestra, Z_2 la distancia entre la muestra y el fotodiodo, w_p , como se dijo anteriormente, es el radio del haz de prueba en la muestra.

La amplitud de la de la modulación de la intensidad en el eje del haz de referencia, TL, debida a la absorción del haz de excitación (modulado) viene definida por θ , que es la diferencia de fase del haz de referencia entre $r=0$ y $r = \sqrt{2}w_e$ inducido por la lente térmica.

$$\theta = -\frac{P_{abs}}{K\lambda_{ref}} \varphi \frac{ds}{dt} \quad (19)$$

donde λ_{ref} es la longitud de onda del láser de referencia, $K = pcD$ es la conductividad térmica de nuestra muestra, c es el calor específico y $\frac{ds}{dt}$ es coeficiente de temperatura, siendo la distancia óptica recorrida, $s = n \cdot l$. P_{abs} la potencia absorbida que se puede calcular siguiendo la ley de Lambert-Beer:

$$P_{abs} = P_{in} \cdot (1 - e^{-\alpha \cdot L}) \quad (20)$$

donde P_{in} es la potencia incidente, α el coeficiente de absorción a la longitud de onda del haz de bombeo y L el grosor de la muestra. El cálculo de la potencia absorbida requiere el conocimiento del coeficiente de absorción de nuestra muestra o bien la medida de la potencia incidente, P_{in} , y la transmitida, P_{out} , por la muestra. Teniendo en cuenta las reflexiones en las caras de la cubeta, la potencia absorbida viene dada por:

$$P_{abs} = \frac{1 - \frac{P_{out}}{P_{in}}}{T} = \frac{1 - \frac{P_{out}}{P_{in}}}{1 - R} = \frac{1 - \frac{P_{out}}{P_{in}}}{\left[\frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2} \right]^2} = \frac{1 - \frac{P_{out}}{P_{in}}}{0.96} \quad (21)$$

siendo n_1 y n_2 los índices de refracción del aire y la muestra, respectivamente.

En la **ecuación (19)**, φ es la fracción de energía absorbida que se convierte en calor, que se llama eficiencia cuántica no radiativa. Para muestras no fluorescentes es igual a uno y para muestras fluorescentes es menor que uno de tal manera que la eficiencia cuántica no radiativa, para muestras fluorescentes, se puede expresar como: $\varphi = 1 - \eta \left(\frac{\lambda_{exc}}{\langle \lambda_{em} \rangle} \right)$, con λ_{exc} la longitud de onda de excitación y $\langle \lambda_{em} \rangle$ la longitud de onda media de emisión, y teniendo que cuenta que tener en cuenta que en cubetas, al no existir la dilatación térmica, $\frac{ds}{dT} = \frac{dn}{dT}$, (Jacinto et al. 2006) con lo que se puede reescribir la **ecuación (19)** como:

$$\Theta = -\frac{\theta}{P_{abs}} = \Theta_0 \left(1 - \eta \frac{\lambda_{ex}}{\langle \lambda_{em} \rangle} \right) \quad (22)$$

donde $\Theta_0 = \frac{\frac{dn}{dT}}{k \lambda_{ref}}$ es un factor que depende de las propiedades térmicas y ópticas de la solución. En el caso de dispersiones diluidas, como en el que nos ocupa, el Θ_0 de la dispersión es prácticamente el mismo que el del solvente puro. La **ecuación (22)** se puede reescribir de la siguiente manera:

$$\theta = P_{abs} \left[\Theta_0 \left(\eta \frac{\lambda_{ex}}{\langle \lambda_{em} \rangle} - 1 \right) \right] \quad (23)$$

En el osciloscopio obteníamos una señal TL transitoria para cada potencia incidente, P_{in} , la cual se ajusta a una curva. De esta curva se obtienen θ y t_c . Mediante la variación de la potencia incidente P_{in} , conseguimos varios valores diferentes de para θ . La representación gráfica de θ frente a P_{in} nos dará una recta de cuya pendiente ($p = \frac{\theta}{P_{abs}}$) podremos, a la vista de la **ecuación (23)**, determinar la eficiencia cuántica de la muestra a estudio:

$$\eta = \left[1 - \frac{\frac{\theta}{P_{abs}}}{\Theta_0} \right] \frac{\langle \lambda_{em} \rangle}{\langle \lambda_{exc} \rangle} \quad (24)$$

Donde $\Theta_0 = 279W^{-1}$ en el caso que nos ocupa, ya que se trata del agua. (Jacinto et al. 2006)

4.2.3. Método experimental para determinar la eficiencia de calentamiento.

En la presente tesis doctoral se ha desarrollado un nuevo método para determinar la eficiencia de calentamiento de distintas nanopartículas. Para ello se ha desarrollado un microscopio de doble haz como el de la **Figura 40**. Con él, como se puede apreciar en el esquema, conseguíamos focalizar en el mismo punto del espacio dos haces contrapropagantes. Uno de los objetivos de microscopio, el inferior, será utilizado para enfocar sobre nuestra muestra un haz calentador, es decir un haz fuertemente absorbido por las nanopartículas bajo estudio. Con el otro objetivo de microscopio, el superior, se focaliza sobre la muestra un haz que excita la luminiscencia de un segundo tipo de nanopartículas que van a ser usadas como nanotermómetros y que son introducidas en la muestra junto a las nanopartículas calentadoras. Con este segundo objetivo se recoge también la fluorescencia de dichos nanotermómetros y se lleva hasta un monocromador acoplado a una CCD, que permite la medida de los espectros de luminiscencia de los nanotermómetros y, por lo tanto, la determinación de la temperatura alcanzada en la muestra como consecuencia de la iluminación de los nanocalentadores. Como inset en la **Figura 40** se puede ver cómo ambos haces inciden en el mismo punto de la muestra.

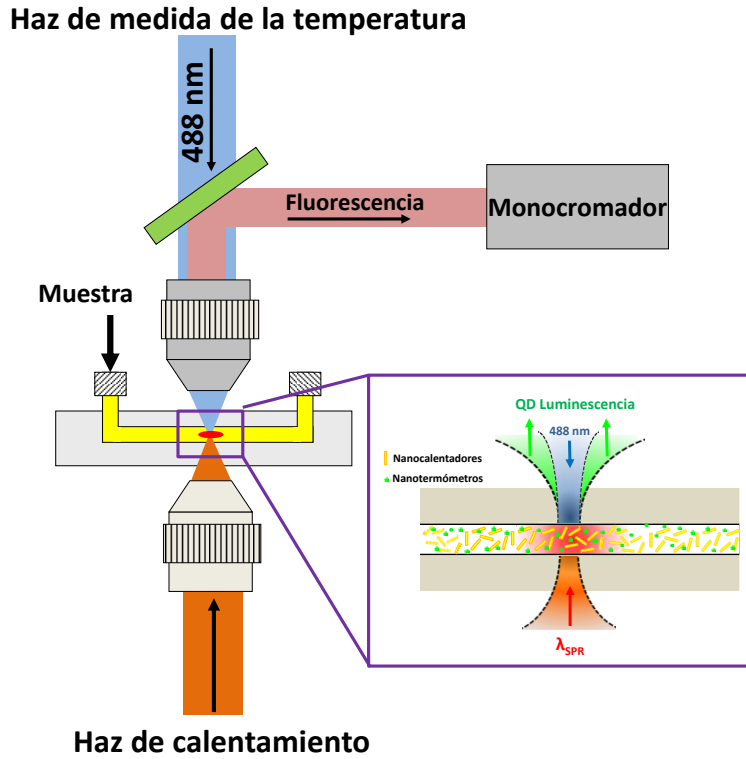


Figura 40. Esquema del montaje experimental del microscopio de doble haz. Como inset en la figura se puede ver aumentado lo que ocurre con los haces en la muestra.

Al hacer incidir dos haces láser de distinta longitud de onda y focalizados con distintos objetivos de microscopio en un mismo punto geométrico del espacio, es importante considerar el solapamiento de dichos haces. Esto es de crucial importancia, ya que uno de los haces proporciona una lectura térmica y el solapamiento de ambos láseres dará una idea de cuál es la extensión del volumen en el que se está midiendo la temperatura. Para ello tenemos en cuenta que la cintura de un haz gaussiano, a lo largo del eje z , se expresa matemáticamente como:

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_R} \right)^2} \quad (25)$$

donde $z_R = \frac{\pi w_0^2}{\lambda}$ y con w_0 la cintura mínima del haz. En nuestro caso tenemos dos haces, uno de 808 nm de longitud de onda, con $w_0 = 0.88 \mu m$ y

$z_R = 3.01\mu m$, y otro de 488 nm de longitud de onda, con $w_0 = 1.4\mu m$ y $z_R = 12.61\mu m$. Teniendo en cuenta que la resolución axial (en el eje z) de la imagen fluorescente (objetivo superior) a la longitud de onda de emisión, λ_{em} y NA (la apertura numérica) del objetivo utilizado, será: (Benayas-Hernández 2012)

$$Resolución\ axial = z = 1.77 \frac{n\lambda_{em}}{NA^2} = 24.67\mu m \quad (26)$$

Podemos concluir que, la temperatura que mediremos tras el análisis de la luminiscencia del objetivo superior estará promediada a lo largo de una distancia axial de aproximadamente 25 μm . Por lo tanto, la temperatura medida a partir de la luminiscencia será la temperatura creada por el haz calentador, si tanto el haz calentador como el haz de medida de la temperatura tienen, a lo largo de una distancia axial de 25 μm , cinturas promedio similares. Para comprobar hasta donde se cumple este hecho, hemos calculado la variación de la cintura del haz de calentamiento y de prueba a lo largo de la distancia axial (ver **Figura 41**) y hemos encontrado que las cinturas medias para el haz de calentamiento y el haz de prueba son $\bar{w} = 2.08\mu m$ y $\bar{w} = 1.60\mu m$ respectivamente. Dado que son tamaños de cintura similares concluimos que la temperatura medida a través de la luminiscencia de los QDs corresponde a la temperatura local generada por el haz de calentamiento.

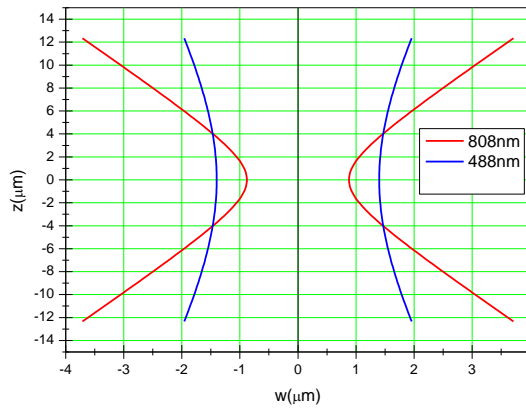


Figura 41. Cintura de los haces láser para un haz calentador de 808 nm y un haz de excitación de la luminiscencia de CdSe-QDs de 488 nm en la resolución axial de nuestro sistema experimental.

El aumento de temperatura debido a los nanocalentadores puede considerarse, en un primer orden de aproximación, proporcional a la potencia absorbida:

$$\Delta T \sim P_{abs} = P_l - P_l \cdot e^{-L \cdot \alpha_{abs}} \quad (27)$$

Siendo P_l la potencia de entrada, α_{abs} , el coeficiente de absorción de la solución que contiene los nanocalentadores y L la longitud atravesada de la muestra. Para bajos valores de $L \cdot \alpha_{abs}$ tendremos que:

$$\Delta T \sim P_{abs} = P_l(1 - e^{-L \cdot \alpha_{abs}}) \approx P_l \cdot [1 - (1 - L \cdot \alpha_{abs})] = P_l \cdot L \cdot \alpha_{abs} \quad (28)$$

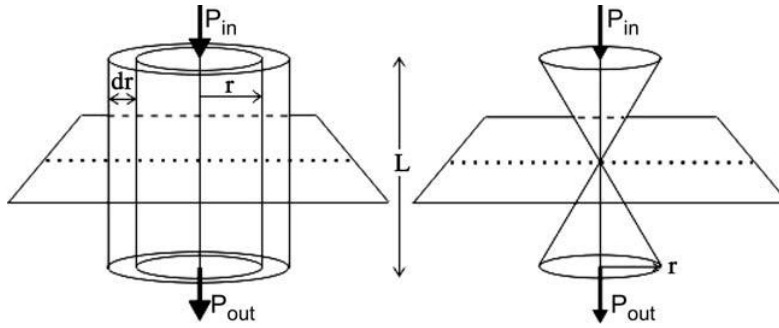


Figura 42 Geometría del modelo utilizado por Mao et para el cálculo del perfil de temperaturas dentro de un microcanal. A la izquierda se puede ver la simetría cilíndrica que sigue la propagación del calor en el eje mientras que a la derecha se puede observar la simetría cónica que sigue el haz de luz calentador real.(Mao et al. 2005)

Podemos aproximar el perfil del láser calentador a un cilindro, como el que se puede ver en la parte derecha de la **Figura 42**. La luz absorbida del láser calentador se transformará en calor que se propagará de forma radial desde el eje del cono. En el plano focal se puede asumir que la propagación del calor sigue una simetría cilíndrica (con un cilindro de radio r como el que se muestra en la parte izquierda de la **Figura 42**), como demuestran Mao et al. (Mao et al. 2005) en cuyo trabajo utilizan un cilindro truncado a la altura a la que se intersecta con el cono de luz calentadora (ver **Figura 42**). El cambio de temperatura entre dos superficies cilíndricas $\Delta T(r, r')$, como la que se muestra en la **Figura 42**, una de radio r (que corresponde a superficie iluminada radiante) y otra de radio $r' > r$ (que corresponde a la superficie que abarca la muestra) está dado por:(Mao et al. 2005)

$$\Delta T(r, r') = T(r) - T(r') = \frac{P_l \cdot \alpha_{abs}}{2 \cdot \pi \cdot K} \ln \left[\frac{r'}{r} \right] \quad (29)$$

Donde α_{abs} es el coeficiente de absorción y K es la conductividad térmica de la muestra, que en nuestro caso la consideramos igual a la del agua.

Para el caso de un haz láser focalizado, como el que se ha utilizado en este trabajo (ver **Figura 42** a la derecha) para medir la eficiencia de calentamiento, se puede utilizar la expresión anterior, sustituyendo r' por la altura del microcanal utilizado ($D = 200 \mu\text{m}$) y r por la cintura del haz, w_l . Por tanto, el aumento de temperatura en el foco estará dado por la siguiente expresión:

$$\Delta T_f = \frac{\alpha_{abs}}{2 \cdot \pi \cdot K} \ln \left[\frac{D}{w_l} \right] P_l \quad (30)$$

Teniendo en cuenta la definición de la eficiencia de calentamiento según la **ecuación (15)**, podemos reescribir la **ecuación (30)** como:

$$\Delta T_f = \frac{\phi \cdot \alpha_{ext}}{2 \cdot \pi \cdot K} \ln \left[\frac{D}{w_l} \right] P_l \quad (31)$$

Por tanto, el aumento de la temperatura en el foco, normalizado por el coeficiente de extinción, será proporcional tanto a la eficiencia de absorción como a la potencia láser:

$$\Delta T_f / \alpha_{ext} = \frac{\phi}{2 \cdot \pi \cdot K} \ln \left[\frac{D}{w_l} \right] P_l \quad (32)$$

y la pendiente (m) de la recta, $\Delta T_f / \alpha_{ext}$ versus P_l será:

$$m = \frac{\phi}{2 \cdot \pi \cdot K} \ln \left[\frac{D}{w_l} \right] \quad (33)$$

Se encuentra entonces que la eficiencia de calentamiento se puede expresar como sigue:

$$\phi = m \frac{2 \cdot \pi \cdot K}{\ln \left[\frac{D}{w_l} \right]} \quad (34)$$

De esta manera se puede determinar fácilmente la eficiencia de calentamiento de las nanopartículas a partir del ajuste lineal de los datos experimentales $\Delta T_f / \alpha_{ext}$ versus P_l .

4.3. Imágenes por fluorescencia.

4.3.1. Microscopio confocal de fluorescencia.

Todos los espectros de emisión, incluidos aquellos dependientes con la temperatura, fueron realizados utilizando un microscopio confocal. Un esquema del montaje experimental utilizado en estos experimentos se muestra en la **Figura 43**. El láser se focaliza mediante un objetivo de microscopio y la señal emitida por la muestra en el plano focal es recogida por el mismo objetivo de microscopio y focalizada en la entrada de un monocromador. Para eliminar la señal láser en el camino de detección se utiliza un divisor de haz y diversos filtros. Dependiendo del diámetro de la abertura confocal (“pinhole”) la cantidad de luz bloqueada por la misma puede ser variada. Al estar la abertura en el plano focal de la segunda lente, solo aquellos rayos generados desde el punto focal del objetivo pasarán por la abertura. Recordemos que antes de la segunda lente los rayos generados desde el foco del objetivo de colección saldrán colimados y paralelos entre sí. Rayos generados en puntos anteriores o posteriores (en la dirección axial) serán colectados por el objetivo pero no colimados, de tal manera que la segunda lente no los focalizará sobre la apertura y no alcanzarán el detector. Es decir, el microscopio confocal puede ser entendido como un sistema óptico capaz de proporcionar resolución espacial a lo largo de la dirección axial (es decir capaz de ofrecer resolución en profundidad) bajo las condiciones adecuadas, puede llegar a tener una resolución (dimensión z) menor de 500nm. (Benayas-Hernández 2012) La muestra se encuentra montada sobre una plataforma motorizada en los dos ejes perpendiculares a la dirección de excitación cuyo tamaño de paso mínimo es de 0.2 μm . El desplazamiento de la plataforma es controlado mediante un programa informático, de forma que es posible obtener mapas espectroscópicos bidimensionales. Para obtener estos mapas bidimensionales, el programa informático divide el área a estudio en una cuadrícula y el haz de bombeo se focaliza en cada uno de los cuadrados que componen la cuadrícula, de forma que a cada pixel de la imagen corresponde un espectro de emisión. A la plataforma sobre la que se coloca la muestra se puede acoplar un sistema de control de la temperatura (Linkam PE120), con el cual es posible seleccionar la temperatura de la muestra en todo momento. El controlador de la temperatura permite la selección de temperaturas entre 25°C y 120°C con una precisión de 0.1°C.

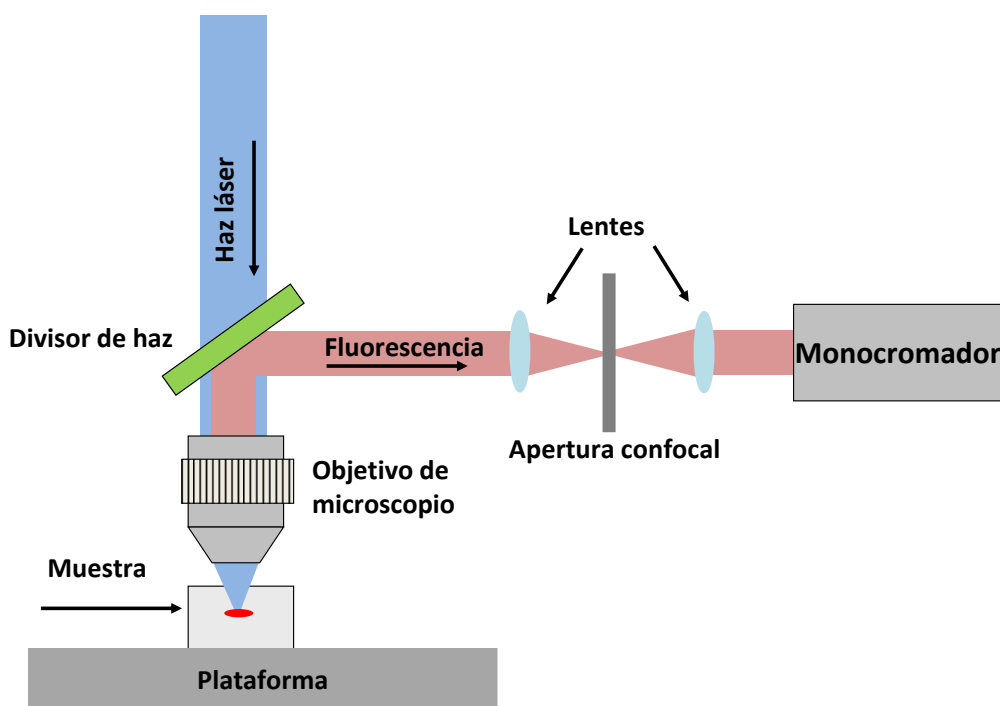


Figura 43. Esquema de los elementos que componen un microscopio confocal láser.

4.3.2. Microscopio multifotónico.

Parte de los experimentos con células vivas (experimentos *in vitro* del **Capítulo 5**) se realizaron en el Servicio de Microscopía Óptica y Confocal del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa con un microscopio Zeiss LSM 710 acoplado a un sistema de excitación con varias fuentes láser, las cuales se podían intercambiar. Entre estas fuentes láser cabe destacar que la utilizada por nosotros fue un láser pulsado Mai Taide Spectra Physics (sintonizable de 710nm a 990 nm con una tasa de repetición de 80 MHz). La diferencia entre un microscopio confocal, como el descrito en la **sección 4.3.1** y un microscopio multifotón son varias, como se puede ver en la figura. Una de ellas es que se eliminan la apertura confocal. Otra de las diferencias es que, en el caso del microscopio multifotón la muestra permanece quieta y el sistema de barrido espacial se consigue mediante el movimiento de un espejo galvánico, el cual consigue enfocar el haz láser en diferentes puntos de la muestra de manera mucho más rápida. La última diferencia radica en el sistema de detección. El sistema consta de un fotomultiplicador acoplado a distintos filtros, los cuales nos permiten detectar la

intensidad en diferentes regiones espectrales. En nuestro caso la detección se realizaba en la parte visible del espectro electromagnético.

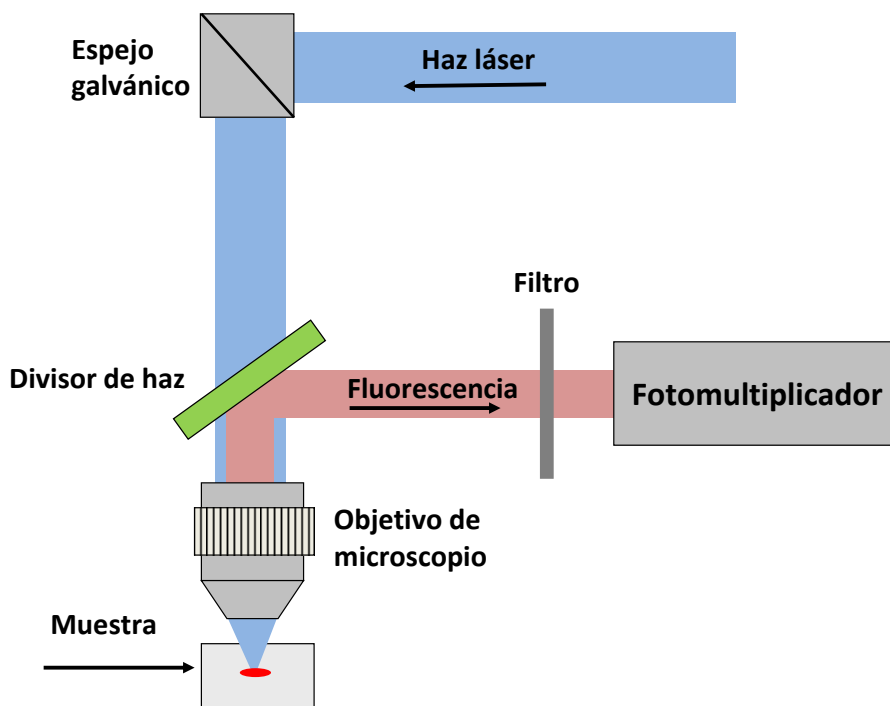


Figura 44. Esquema de los elementos que componen un microscopio multifotón.

4.3.3. Imagen térmica.

En la presente tesis se han generado imágenes térmicas de dos maneras distintas:

- Mediante el análisis de la luminiscencia de nanotermómetros (imágenes térmicas fluorescentes). En esta técnica se utiliza un microscopio confocal descrito en la **sección 4.3.1** en el cual se mueve la muestra, consiguiendo espectros de luminiscencia de diferentes puntos de la muestra, los cuales, tras su análisis espectral, proporcionan una imagen térmica bidimensional.
- Mediante una cámara térmica Fluke i110 (imágenes debidas a la “radiación térmica” del sistema estudiado). Esta cámara tiene como detectores microbolómetros. La radiación térmica (infrarroja) de longitudes de onda entre $7.5\ \mu\text{m}$ y $14\ \mu\text{m}$ llega al detector elevando su temperatura y por tanto cambiando su resistencia eléctrica. El

cambio en la resistencia eléctrica es medido y, mediante una calibración compleja, relaciona la intensidad de la luz que llega al detector con la radiación del cuerpo negro emitida por la muestra, y por tanto, con su temperatura, con lo cual pueden generarse imágenes térmicas superficiales.

4.4. Experimentos de terapia fototérmica *in vivo*.

Los experimentos *in vivo* descritos en la **sección 6.2** fueron llevados a cabo en el animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" (IIBM). Para ello fue precisa la movilización de material desde el Campus de Cantoblanco hasta el propio Instituto de manera que se pudiera establecerse un sistema experimental apropiado. Dicho sistema se encuentra esquematizado en la figura. En ella se ve como la inyección de nanopartículas subcutánea realizada a un ratón, vivo y anestesiado, se excita con una fuente láser mientras que la temperatura superficial alcanzada en el punto de la inyección se registraba con una cámara térmica Fluke i110.

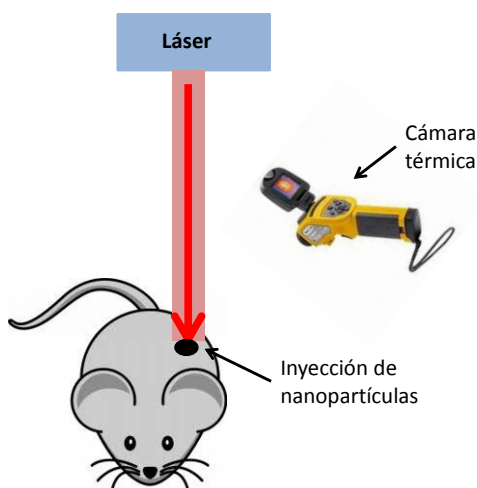


Figura 45. Esquema del sistema experimental utilizado en los experimentos *in vivo*.

5. Nanotermómetros

Introducción

Un gran número de eventos celulares, tales como la división celular, están marcados por cambios en la temperatura.(Hildebrandt et al. 2002) La comprensión de la dinámica de producción de calor y su distribución dentro de la propia célula sólo puede ser posible tras un meticuloso análisis de la temperatura intracelular. Además, es bien sabido que varias patologías como el cáncer están caracterizadas por la producción de calor.(Kuruganti and Qi 2002) Consecuentemente, la monitorización de la temperatura intracelular no sólo permite la comprensión de un gran número de eventos celulares, también lleva a la posibilidad de detectar enfermedades a nivel celular, lo cual permitiría el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico y terapia. Sin embargo, como ya se mencionó en el **Capítulo 1**, obtener la distribución de temperatura intracelular es, a día de hoy, un gran reto para la comunidad científica. Sin embargo la microscopía de fluorescencia propone una gran alternativa a estos métodos. Esta técnica aprovecha la sensibilidad de varios parámetros de la fluorescencia a los cambios de la temperatura en el rango fisiológico de temperaturas (de los 30°-50°C). La microscopía de fluorescencia es un método que permite la aplicación de la termometría intracelular sin contacto y que, además, presenta una alta resolución espacial (tan sólo limitada por el límite de difracción, que, por ejemplo, para luz azul de 488 nm está en aproximadamente 0.25 μm) y una gran resolución temporal (llegando a los nanosegundos).

Los métodos tradicionales de termometría de fluorescencia están basados en las propiedades de fluoróforos moleculares, tales como proteínas y moléculas orgánicas.(Jaques and Vetrone 2012) En general, estas moléculas orgánicas se pueden incorporar fácilmente dentro de células vivas. Sin embargo, estos fluoróforos pueden presentar una serie de problemas, como una pobre fotoestabilidad o la dependencia de las propiedades fluorescentes con el entorno, como puede ser el pH, la viscosidad o la concentración de iones de Ca^{2+} .(Resch-Genger et al. 2008) Esta dependencia con el entorno hace muy importante la calibración de las propiedades luminiscentes para cada entorno particular, lo que puede no resultar práctico.

Últimamente, el gran desarrollo de la nanotecnología ha hecho posible la fabricación de una gran variedad de compuestos fluorescentes en el rango

nanométrico, cuyo tamaño puede variar de unos pocos nanómetros a los cientos de ellos. Las pequeñas dimensiones de estas sondas ópticas, mucho menores que el tamaño típico de una célula animal (que es del orden de las decenas de micrómetros), y la posibilidad de la funcionalización de su superficie, facilita la internalización de estas sondas en células y, consecuentemente, la posibilidad de la obtención de imágenes fluorescentes. Es más, la variación de las propiedades fluorescentes de estas nanosondas con la temperatura puede utilizarse para determinar la temperatura intracelular.

En el presente capítulo se estudiarán las propiedades luminiscentes de puntos cuánticos (Quantum dots, QDs) de semiconductores. Estas nanopartículas son muy utilizadas en aplicaciones de bioimagen debido a su alta eficiencia cuántica y su fotestabilidad, siendo uno de los marcadores más utilizados en la literatura como marcadores fluorescentes. En el capítulo se estudiará la emisión luminiscente de QDs de CdTe con el objetivo de determinar si existe un tamaño óptimo en aplicaciones de bioimagen, esto es, si para algún tamaño se maximiza la eficiencia cuántica; una vez encontrado este tamaño óptimo, se estudiarán los cambios en la luminiscencia, posición del pico de emisión, intensidad del pico de emisión, tiempo de decaimiento de QDs de CdTe y CdSe de este tamaño óptimo para su utilización como nanotermómetros. Para aplicaciones en sistemas biológicos se utilizarán los QDs de CdSe cercanos al tamaño óptimo encontrado anteriormente, ya que estas QDs son más estables al ser estructuras de núcleo-corteza.

También se estudiarán los QDs como nanotermómetros para llevar a cabo imágenes térmicas en fluidos y en células vivas. Como en última instancia lo que se pretende es la utilización de estas nanopartículas en aplicaciones *in vivo*, la última parte del capítulo se dedica al estudio de imágenes en profundidad a través de tejidos biológicos simulados mediante el uso de QDs que emitan en el infrarrojo.

5.1. Tamaño óptimo para imagen fluorescente.

Para cualquier aplicación de bioimagen, uno de los parámetros claves a tener en cuenta, es la eficiencia cuántica de fluorescencia (Quantum Yield, o QY, por sus siglas en inglés), ya que determina la mayor o menor intensidad de la fluorescencia para determinada intensidad de la luz absorbida.

La eficiencia cuántica de fluorescencia (QY), se define como el cociente entre el número de fotones emitidos y absorbidos por unidad de tiempo, que a su vez viene determinado por las probabilidades de desexcitación radiativa (k_{rad}) y no radiativa (k_{nrad}), de tal manera que:

$$QY = \frac{k_{rad}}{(k_{rad} + k_{nrad})} \quad (35)$$

La intensidad de la fluorescencia depende tanto de la de la eficiencia cuántica como del coeficiente de absorción, por lo tanto:

$$I \sim \alpha \cdot QY = \sigma \cdot N \cdot QY \quad (36)$$

Donde N es la concentración de QDs en la solución a estudio y σ es la sección eficaz de absorción. La eficiencia cuántica no sólo determina la intensidad de la fluorescencia de las nanopartículas (y, por tanto, el contraste de la bioimagen), sino también, determina la carga térmica inducida por el láser de excitación al iluminar el sistema. Si disminuye la eficiencia cuántica de las nanopartículas utilizadas en el sistema, la carga térmica, debida a la relajación no radiativa, puede llegar a inducir alteraciones térmicas indeseadas en el sistema biológico durante el proceso de imagen. Por otra parte, estas alteraciones térmicas pueden ser beneficiosas a fin de calentar el sistema estudiado para propósitos terapéuticos. Por tanto, la búsqueda de los parámetros que maximicen la eficiencia cuántica de fluorescencia es de suma importancia para diversas aplicaciones biológicas.

En nuestro caso, entre los parámetros que podemos estudiar para determinar el cambio en la eficiencia cuántica de fluorescencia, el tamaño de los QDs es uno de los que puede ser más crítico, ya que estudios previos sobre la vida

media fluorescente de QDs han señalado que tanto la vida media radiativa como la no radiativa de los QDs dependen del tamaño de las nanopartículas. (Ebenstein et al. 2002, Schlegel et al. 2002, Wuister et al. 2003, van Driel et al. 2005, Grabolle et al. 2009, Leistikow et al. 2009, Dantas et al. 2011)

Para este estudio disponíamos de ocho tipos de QDs de tamaños distintos, todos de CdTe de la casa Plasmachem Inc., cuyas dimensiones, como ya se mencionó en el **Capítulo 4**, han sido determinadas tanto por el análisis de sus propiedades espectroscópicas (Yu et al. 2003) como por el análisis de las imágenes de TEM (ver **Tabla 2**). La estructura y funcionalización de las nanopartículas, como también se mencionó en el **Capítulo 4**, consta de un núcleo de CdTe solamente rodeado de moléculas orgánicas que posibilitan su dispersión en agua.

Los ocho tipos distintos de CdTe-QDs fueron dispersados en agua destilada manteniendo la misma concentración en peso (0.33%). Todos presentaban una apreciable fluorescencia tras ser excitados por un láser continuo de argón (488 nm) de intensidad fija. Sin embargo, la intensidad emitida cambia con el tamaño del QD, tal y como también puede apreciarse en la **Figura 46 (a)**, que muestra tres fotografías de tres disoluciones de CdTe-QDs de distintos tamaños y su fluorescencia.

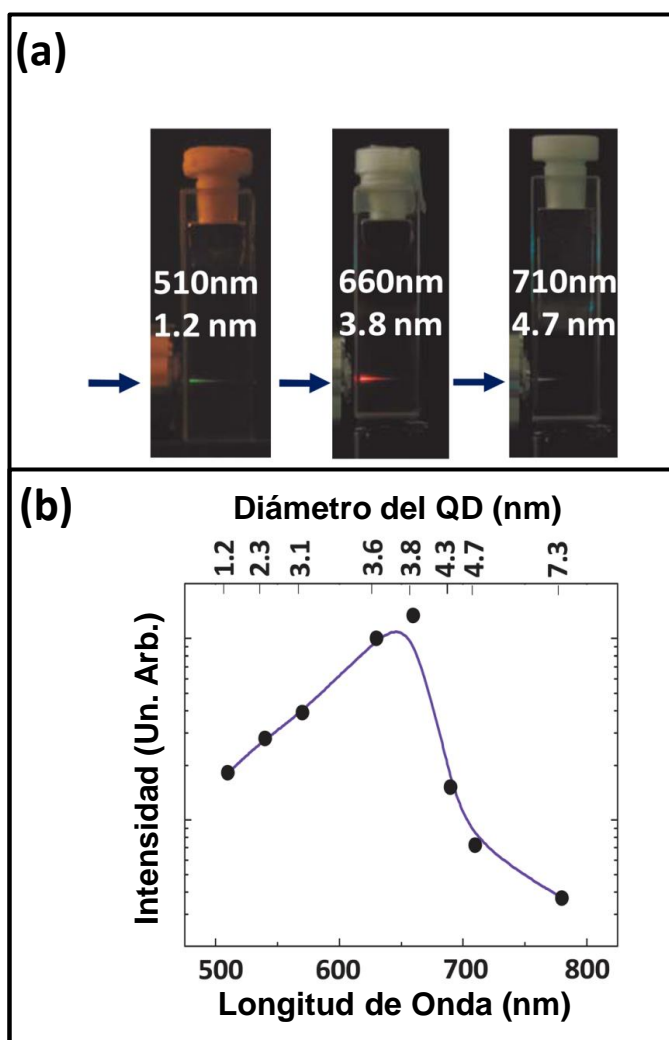


Figura 46. (a) Fotografías digitales de tres dispersiones de CdTe-QDs, cuyos tamaños y picos de emisión están indicados en la propia figura. Las flechas azules representan el haz laser de excitación a 488 nm. (b) Intensidad emitida normalizada por las intensidades óptica absorbida y corregida por la respuesta del sistema experimental de detección en función del máximo de emisión y del tamaño del CdTe-QD (escala superior). Los puntos son los datos experimentales mientras que la línea sólo actúa como guía para los ojos.

Puede apreciarse que, los CdTe-QDs correspondientes a un tamaño de 3.8 nm (emisión a 660 nm), presentan una emisión más intensa que los de 1.2 nm (emisión a 510 nm) y 4.7 nm (emisión a 710 nm). Para poder cuantificar este hecho, los espectros de emisión de todas las soluciones de CdTe-QDs, fueron registrados utilizando un microscopio confocal de fluorescencia (descrito en la

sección 4.3.1) y la misma configuración experimental (con la misma geometría y el mismo porcentaje en peso de nanopartículas). Los espectros obtenidos fueron corregidos por la respuesta espectral del sistema de detección y normalizados por la intensidad de excitación absorbida por cada muestra.

En la **Figura 46 (b)** se muestra la intensidad emitida por las distintas disoluciones de nanopartículas en función del máximo a que aparece el pico de emisión (diámetro del QD). Puede observarse como la intensidad presenta un máximo para los QDs que emiten a 660 nm (diámetro de 3.8 nm), ya que para los QDs de menor tamaño la intensidad crece al aumentar el tamaño, mientras que para los QDs de tamaño superior a este, la intensidad disminuye fuertemente al aumentar el tamaño.

Estos resultados, como se verá a continuación, están corroborados con los obtenidos al determinar la eficiencia cuántica a partir del método de la lente térmica (TLS)

Como ya se mencionó en el **Capítulo 4**, el método de la lente térmica (Thermal Lens Spectroscopy, TLS), utilizado para determinar la eficiencia cuántica de las nanopartículas, está basado en un montaje experimental con dos haces, uno que sirve como referencia y otro como excitación. En nuestro caso particular el láser de excitación era un láser de Argón emitiendo a 488 nm (absorbido por los QDs) mientras que el láser de referencia era un láser de He-Ne emitiendo a 632 nm.

Del análisis de la relación entre la amplitud de la señal transitoria obtenida y la potencia y longitud de onda de excitación, podemos determinar la eficiencia cuántica de fluorescencia sin necesidad de recurrir a muestras de referencia, como ya se explicó en el **Capítulo 4**.

Todas las dispersiones de CdTe-QDs fueron analizadas mediante esta técnica y los resultados de la dependencia de la eficiencia cuántica de fluorescencia con el tamaño (y por tanto el pico de emisión) de las distintas nanopartículas se muestran en la **Figura 47 (a)**.

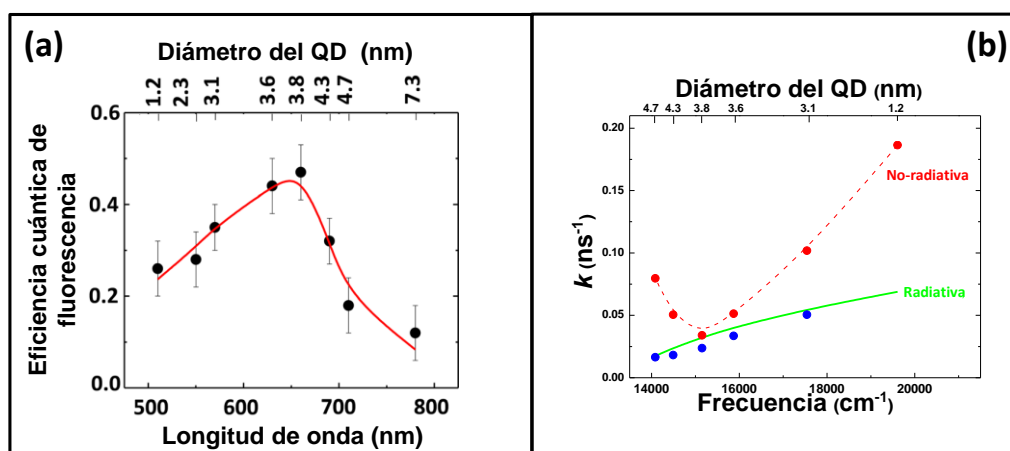


Figura 47 (a) Eficiencia cuántica de fluorescencia de las dispersiones de CdTe-QDs en función de los distintos picos de emisión (escala inferior) y tamaños (escala superior) de las nanopartículas. Los puntos son los datos experimentales mientras que la línea es una guía para los ojos. (b) Probabilidades de decaimiento radiativas y no radiativas de todas las dispersiones de CdTe-QDs utilizadas en esta tesis en función de la energía del pico de emisión (o tamaño, escala superior). La línea continua es la vida media radiativa calculada de acuerdo con la referencia (van Driel et al. 2005), Los puntos azules corresponden a la probabilidad de decaimiento radiativa calculada de la cola exponencial de las curvas de vidas medias. Los puntos rojos corresponden a las probabilidades de desexcitación no radiativas estimadas a partir de la eficiencia cuántica de la vida media radiativa. La línea discontinua actúa como guía para los ojos.

En dicha figura se pueden observar claramente los dos regímenes que ya aparecían en la **Figura 46 (b)**; para CdTe-QDs con tamaños mayores a 3.8 nm (máximos de emisión superior a 660 nm) la eficiencia cuántica de fluorescencia decrece según crece el tamaño de la nanopartícula (y su pico de emisión). Sin embargo para tamaños menores que 3.8 nm (máximos de emisión inferiores a 660 nm), la eficiencia cuántica de fluorescencia crece al aumentar el tamaño de la nanopartícula (y aumentar, por tanto, su longitud de onda de emisión). Este último comportamiento ya ha sido reportado por otros autores, como M Grabolle *et al.*, quienes midieron la eficiencia cuántica de fluorescencia de distintos CdTe-QDs, cuyos tamaños variaban de 2 a 3.5 nm, utilizando como referencia muestras de colorantes. Estos autores encontraron unas eficiencias cuánticas de 0.27 para los CdTe-QDs de 2.2 nm, de 0.34 para los de 2.9 nm, 0.36 para los de 3.1 nm y 0.6 para los de 3.5 nm; siguiendo la misma tendencia que se observa en la **Figura 47(a)**. (Grabolle et al. 2009)

Como se puede observar en la **Figura 47(a)** el cruce entre el régimen creciente y decreciente ocurre para el tamaño de 3.8 nm (pico de emisión de 660 nm). Para este tamaño, la eficiencia cuántica de fluorescencia es de 0.47, un valor comprendido entre otros encontrados en la literatura, que oscilaban entre 0.25 y 0.6 para CdTe-QDs. (Kershaw et al. 1999, Walker et al. 2003, Wuister et al. 2003).

Estos valores encontrados en la literatura pueden parecer muy dispares, pero es importante recalcar aquí la gran importancia que tienen los métodos y condiciones de síntesis, que pueden resultar en una eficiencia cuántica de fluorescencia muy distinta. Esto puede ocurrir incluso con el mismo método de síntesis. En nuestros experimentos minimizamos esta posibilidad utilizando nanopartículas producidas en distintas hornadas por la misma empresa. Los distintos resultados encontrados en nuestro caso entraban siempre dentro de las barras de error que se pueden ver en la **Figura 47 (a)**. El valor máximo de la eficiencia cuántica de fluorescencia se da para 3.8 nm sin ningún lugar a dudas. Esto quiere decir que, para un tamaño determinado, el cociente entre los fotones emitidos y absorbidos alcanza un máximo. Como se puede comprobar observando tanto la **Figura 46 (b)** como la **Figura 47 (a)** llegamos al mismo resultado cualitativo tanto en el caso de las medidas de fluorescencia normalizada como para las medidas de la eficiencia cuántica de fluorescencia.

Por tanto, y para llegar a comprender mejor la dependencia del tamaño de la eficiencia cuántica de fluorescencia, realizamos medidas de vidas medias. En nuestro caso, como las curvas de decaimiento no fluctuaban con el tiempo, es decir, la medición de la misma muestra varias veces llevaba a obtener la misma curva, podemos deducir que nuestros experimentos carecían de efectos de parpadeo ("blinking effect").(Fisher et al. 2004) La vida media de los CdTe-QDs más pequeños (1.2 nm) no fue medida en nuestro sistema experimental ya que su valor estaba demasiado cercano a nuestro límite de resolución (10 ns).

Cabe destacar que la dinámica temporal de la fluorescencia de los QDs no está todavía completamente entendida. Como se ha mencionado anteriormente, la forma de la curva temporal de decaimiento de un QD fluctúa con el tiempo debido a efectos de parpadeo. Sofisticadas medidas de resolución temporal en CdSe-QDs han mostrado que estas fluctuaciones en la vida media son debidas a fluctuaciones en la vida media no radiativa. No obstante, estos procesos de

fluctuación pueden minimizarse si se excita un número relativamente elevado de QDs. En nuestro caso, dentro del límite de resolución temporal (ver **Figura 48**) se observa una componente exponencial a tiempos largos que, según Fisher et al, está fundamentalmente asociada a la vida media radiativa. (Fisher et al. 2004); es decir $\tau \simeq \tau_0$.

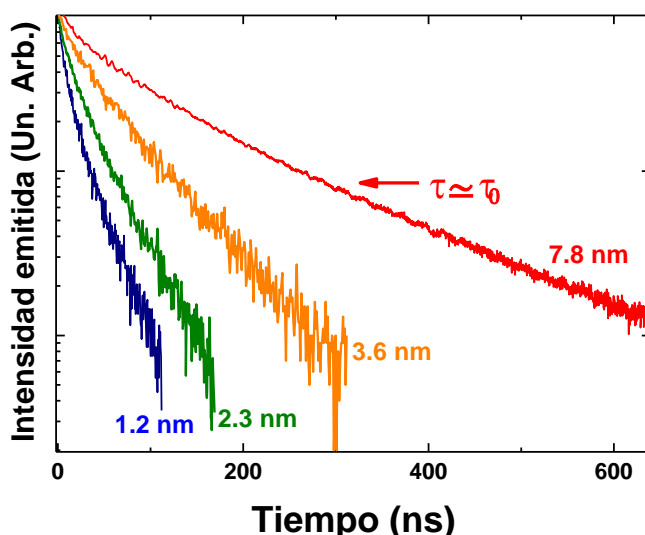


Figura 48. Curva temporal de decaimiento de la luminiscencia de las dispersiones de CdTe-QDs. La vida media radiativa se obtiene de la componente experimental a tiempos largos (ver por ejemplo la correspondiente a 7.8 nm, indicada en la figura)

Ya que la inversa de la vida media de fluorescencia se puede expresar como la suma de las inversas de la vida media radiativa y la no radiativa, como se puede ver en la **ecuación (37)**, hemos estimado la posibilidad de decaimiento radiativo como la inversa de la contribución larga de la curva de decaimiento.

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_0} + \frac{1}{\tau_{nr}} \quad (37)$$

En la **Figura 47 (b)** se han representado mediante puntos azules las probabilidades de desexcitación radiativa $\left(\frac{1}{\tau_0}\right)$ para distintos tamaños (picos de emisión) de CdTe-QDs. Estas probabilidades han sido estimadas a partir de la medida experimental de las vidas medias fluorescentes (es decir, suponiendo que

la componente experimental lenta observada corresponde a la vida media radiativa ($\frac{1}{\tau} \approx \frac{1}{\tau_0}$). La línea continua indica los valores de la probabilidad de excitación radiativa estimada en el trabajo de van Driel *et al.* Debe notarse como nuestros valores experimentales de $\frac{1}{\tau_0}$ son consecuentes con la mencionada estimación.

Los valores de las probabilidades de decaimiento radiativo junto con los valores de la eficiencia cuántica de fluorescencia medidos anteriormente, por el método de la lente térmica, han sido utilizados para determinar la probabilidad de decaimiento no radiativo de todas las dispersiones de CdTe-QDs utilizadas mediante la siguiente relación: $k_{\text{nrad}} = k_{\text{rad}} \cdot (\frac{1}{QY} - 1)$, obtenida a partir de la **ecuación (35)**.

Los valores de la probabilidad de decaimiento no radiativo están representados como puntos rojos en la **Figura 47 (b)**.

Una inspección detallada de la **Figura 47(b)** revela que, al contrario del comportamiento observado para la probabilidad de decaimiento radiativo, cuyo valor aumenta con la energía del máximo de emisión (es decir, al disminuir el tamaño), la probabilidad de decaimiento no radiativo presenta dos regímenes bien definidos. Para energías de emisión menores a aproximadamente 15000 cm^{-1} (QDs mayores a 3.8 nm), la probabilidad de decaimiento no radiativo decrece según aumenta la energía del pico de emisión (el tamaño disminuye). Por otro lado, para energías mayores a 15000 cm^{-1} (QDs menores a 3.8 nm), la probabilidad de decaimiento no radiativo aumenta fuertemente según el tamaño de la nanopartícula disminuye (la energía del pico de emisión aumenta).

Gracias a estos resultados se podrán explicar los resultados encontrados en la **Figura 47 (a)**, en la cual se encontraban dos regímenes para la eficiencia cuántica de la fluorescencia.

El régimen observado (para QDs mayores a 3.8 nm) puede explicarse mediante el aumento de k_{nrad} con el tamaño del QD. Dicho aumento puede estar causado por un mayor acoplamiento entre estados superficiales aceptores y

estados electrónicos intrínsecos al aumentar el tamaño del QD, lo que conlleva una mayor probabilidad de decaimiento no radiativo, como ya se mencionó en el **Capítulo 2**. Este hecho es en parte debido a que cuanto mayor sea el tamaño del QD, menor será su confinamiento cuántico, por lo cual, la separación entre los estados electrónicos del CdTe-QDs será menor. Consecuentemente, la migración a estados superficiales se hace más probable.

Por otra parte, el régimen observado para QDs menores a 3.8 nm puede explicarse gracias al gran aumento de la probabilidad de decaimiento no radiativa al disminuir el tamaño del QD. Este incremento en la probabilidad de decaimiento no radiativo puede ser debido a un aumento en la densidad de trampas (estados) superficiales que pueden ocurrir como consecuencia de incrementar el cociente entre superficie y volumen. También cabe destacar que los CdTe-QDs utilizados en este trabajo no tenían ningún recubrimiento que pudiera reducir el número de estas trampas, como puede ocurrir en otros tipos de QDs en los que se utiliza un recubrimiento con otros tipos de semiconductores para minimizar los efectos de superficie, como es el caso de los CdSe/SZn-QDs que poseen una estructura de “núcleo-corteza” (“core(CdSe)-shell(SZn)”). Cabe incluso pensar que el recubrimiento que hace posible la dispersión en agua de muestras de CdTe pueda ayudar a la formación de trampas superficiales que incrementen las probabilidades de decaimiento no radiativo que serán más acusadas cuanto mayor sea el cociente entre superficie y volumen, esto es, para QDs más pequeños.

Como hemos podido comprobar, existe un tamaño (y por tanto longitud de onda de emisión) donde la eficiencia cuántica es máxima; por lo tanto, este tamaño (3.8 nm) debería corresponder al tamaño óptimo para aplicaciones de bioimagen. La dependencia de la eficiencia cuántica de fluorescencia con el tamaño de los QDs que hemos observado se explica satisfactoriamente con la variación de k_{nrad} con el tamaño del QDs estudiado en el presente capítulo.

5.2. Sensibilidad térmica de la fluorescencia.

Para estudiar la sensibilidad térmica de la fluorescencia elegimos CdSe-QDs de tamaño aproximado de 4 nm (es decir, cerca del tamaño óptimo encontrado en la **sección 5.1** para CdTe-QDs) de la casa comercial Invitrogen. Al contrario de lo que ocurría con los CdTe-QDs, cuya estructura está formada por un núcleo de CdTe rodeado de moléculas que posibilitan su dispersión en agua, como se mencionó en el **Capítulo 4**, los CdSe-QDs presentan una estructura de “núcleo-corteza” (“core-shell”), con un núcleo de CdSe (4 nm) rodeado de una capa de ZnS (1 nm) que a su vez está recubierta de un polímero que posibilita su dispersión en solventes orgánicos.

La emisión de los CdSe-QDs utilizados está centrada en 650 nm, muy cerca de la emisión óptima encontrada en la **sección 5.1** para los CdTe-QDs, pero son mucho más estables en dispersión acuosa que los CdTe-QDs gracias a su estructura de “core-shell”. Además, dicha estructura “core-shell” y tamaño están diseñados para optimizar la eficiencia cuántica.

Los CdSe-QDs se dispersaron en una solución tampón de fosfato salino (conocido como PBS por sus siglas en inglés) a una concentración de 0.3 μM . La dispersión resultante se colocó en una cubeta encima de una placa calentadora, de tal manera que su temperatura pudiera variarse en el rango biológico, de los 30°C a los 60°C, y se estudió cómo variaban sus propiedades ópticas; coeficiente de extinción, espectro de emisión y vida media, como se puede apreciar en la **Figura 49**.

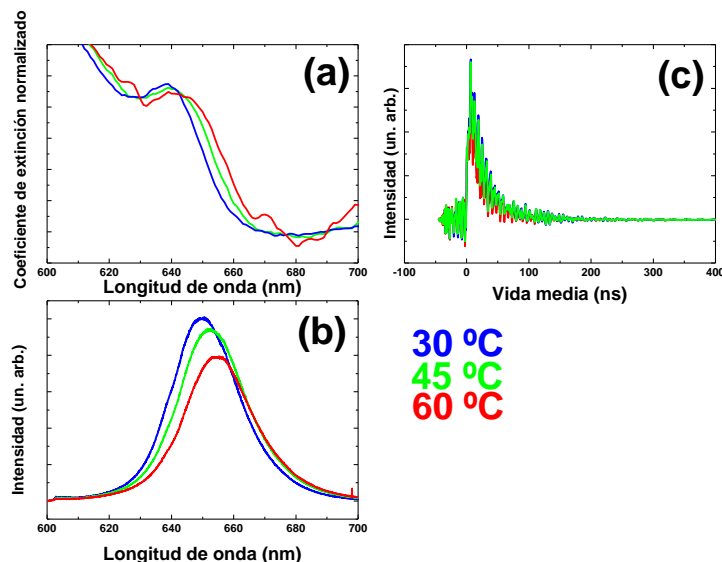


Figura 49. (a) Coeficiente de extinción normalizado en función de la longitud de onda a tres temperaturas (30°C, 45°C y 60°C) para CdSe-QDs dispersos en agua. (b) Espectro de luminiscencia a tres temperaturas (30°C, 45°C y 60°C) de CdSe-QDs dispersos en agua. (c) Curvas de decaimiento de la luminiscencia (30°C, 45°C y 60°C) para CdSe-QDs dispersos en agua.

En la **Figura 49 (a)** se puede ver cómo se modifica el espectro de extinción con la temperatura, mostrándose dicho espectro a tres temperatura distintas. Se observa un desplazamiento del pico de primer excitón hacia el rojo al aumentar la temperatura. La energía correspondiente a la primera transición excitónica, como ya se detalló en el **Capítulo 2**, depende de varios efectos relacionados con la temperatura, como la expansión térmica del QD en el ambiente en el que se encuentre, los cambios en la energía de confinamiento inducidos por la temperatura y los cambios en la magnitud de acoplamiento electrón-fonón inducidos por la temperatura. La sensibilidad a la temperatura del primer pico de excitón $\left(\frac{dE_{1,0}}{dT}\right)$ de los CdSe-QDs es altamente dependiente del tamaño del QD y, como ya se mencionó en el **Capítulo 2 (Figura 6)**. Esta dependencia se puede explicar considerando tres contribuciones significativas, ver **ecuación (5)**

De la **ecuación (5)** se deduce, como se puede ver en la **Figura 9** que la posición del primer pico de excitón con la temperatura puede depender fuertemente (de las propiedades) y tamaño de material que constituya el QD.

La **Figura 49 (b)** muestra cómo varía el espectro de emisión de los CdSe-QDs según se aumenta la temperatura. Se puede ver claramente como la emisión sufre un desplazamiento hacia el rojo a la vez que la intensidad de la luminiscencia disminuye. Este desplazamiento hacia el rojo está relacionado con el desplazamiento que sufre el primer pico de extinción (primer excitón), que acabamos de mencionar (ver **Figura 6**). Por otra parte, el descenso de la intensidad de luminiscencia, puede ser debido a que los pares electrón-hueco del excitón tienden a estar más deslocalizados con el aumento de la temperatura, haciendo que sea más probable que lleguen a una trampa superficial y/o que la desexcitación tenga lugar a través de canales no radiativos, con lo que la intensidad de la luminiscencia experimenta un descenso. En los QDs semiconductores las trampas que hacen que descienda la intensidad de la luminiscencia suelen ser estados superficiales, así que el ambiente en el que se encuentre el QDs es esencial. De esta manera, las estructuras de “core-shell” se vuelven muy importantes en las aplicaciones en las que la temperatura juega un papel relevante. Por otro lado, que la intensidad de la luminiscencia disminuya bruscamente en las estructuras “desnudas”, respecto a las “core-shell”, convierte a aquel tipo de nanopartículas en unos nanotermómetros más sensibles, ya que ligeros cambios de temperatura afectan sensiblemente a las emisiones desde átomos superficiales. En este caso habrá que sopesar ambas opciones para llegar a elegir la nanopartícula más adecuada en cada tipo de aplicación particular.

Por último, también investigamos, como se puede ver en la **Figura 49 (c)**, el decaimiento temporal de la luminiscencia. En dicha figura se muestran los decaimientos a tres temperaturas distintas. En todos los casos dicho decaimiento muestra una forma exponencial. Se observó además (más evidenciado en la **Figura 50 (b)** de la que se hablará más adelante), que la vida media no sufre un cambio muy significativo cuando se aumenta la temperatura.

Con esta información se puede concluir que, en principio, podemos utilizar estos CdSe-QDs como nanotermómetros valiéndonos de dos parámetros distintos; la posición del pico de luminiscencia y la intensidad de la emisión.

En la parte superior de la **Figura 50 (a)** puede verse como tanto la posición del primer pico de excitón en extinción como la posición del máximo de emisión siguen un desplazamiento hacia el rojo según se aumenta la temperatura de la muestra, con la misma tendencia (pendiente) lineal. Es importante observar que dicho resultado implica que el “Stokes-shift” para este tipo de QDs es prácticamente constante cuando aumentamos la temperatura, por lo que, el cambio en la posición del pico de luminiscencia, que utilizaremos como marcador de temperatura, está claramente producido por el cambio en la posición del primer pico de excitón.

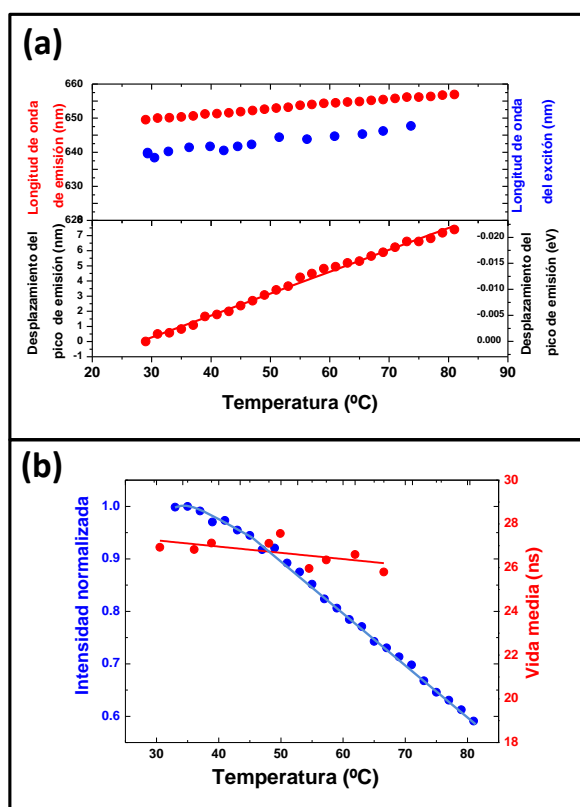


Figura 50. (a) Parte superior: Posición espectral del pico de extinción del primer excitón (azul) y posición del máximo de emisión (rojo) de los CdSe-QDs en función de la temperatura. Parte inferior: Calibración del desplazamiento hacia el rojo del pico de emisión con la temperatura de los CdSe-QDs; los puntos son los datos experimentales mientras que la línea es el ajuste lineal (0.11nm/°C de pendiente). (b) Intensidad del máximo de emisión (azul) y vida media (rojo) de los CdSe-QDs en función de la temperatura; los puntos son los datos experimentales mientras que las líneas son sólo una guía para los ojos.

En la parte inferior de la **Figura 50 (a)** podemos ver la calibración del desplazamiento de la posición del máximo de emisión con la temperatura. Ajustando los puntos experimentales a una recta obtenemos que el pico de emisión se desplaza hacia el rojo al cambiar la temperatura a un ritmo de 0.11 nm/°C .

En la **Figura 50 (b)** podemos ver cómo se modifica la intensidad de la luminiscencia con la temperatura. Estos datos se podrían, en principio, también utilizar para medir la temperatura a través de las variaciones de intensidad. Sin embargo hay que tener en cuenta que la intensidad de la luminiscencia depende de la concentración de QDs, con lo que para aplicaciones de imagen, sólo se podrá utilizar este parámetro en el caso en que la concentración de QDs se mantenga constante en la región que queremos examinar. Esto implica que, por ejemplo, una presumible imagen térmica celular, sólo sería válida si hubiese una distribución homogénea de los QDs dentro de la célula. Este método, por tanto, es bastante limitado. La reducción en la intensidad de luminiscencia de los QDs puede explicarse, como se vio en la **sección 2.2.3**, tanto por el decaimiento por fonones via trampas pre-existentes como por la creación térmica de nuevas trampas de decaimiento fonónico (ver **Figura 12**).

En la **Figura 50** se puede ver también, en puntos rojos, cómo varía la vida media al aumentar la temperatura con la temperatura. La pequeña disminución del valor de la vida media que se puede ver en la gráfica entra dentro del error experimental en el sistema de medida y hace poco viable la medida de la temperatura mediante este método.

Cabe resaltar que, como puede observarse en la **Figura 50 (b)**, la variación de la intensidad con la temperatura sufre una fuerte disminución mientras que el valor de la vida media se mantiene prácticamente constante con la temperatura. Esto se debe, como se mencionó en el **Capítulo 2**, a que el quenching que sufren los QDs no puede explicarse mediante los mismos mecanismos que el que sufren los centros localizados, es un quenching que depende fuertemente del entorno en el que se encuentren los QDs, como ya estudiaron el grupo de Zhao et al, quienes observaron que la disminución de la intensidad con la temperatura depende de la creación de trampas creadas térmicamente. (Zhao et al. 2012)

Por tanto, la medida de la temperatura mediante CdSe-QDs podremos obtenerla de dos maneras distintas, mediante el cambio en la intensidad de la emisión, en los casos en los que la concentración de las nanopartículas se mantenga constante, y mediante el desplazamiento hacia el rojo del pico de emisión, esta última manera siendo independiente de la distribución de concentración, y, por tanto, más fiable.

Por último, y con el objetivo de comparar dos matrices semiconductoras distintas como potenciales nanotermómetros, se estudió también la dependencia del desplazamiento del pico de emisión con la temperatura para los CdTe-QDs (“desnudos”) cuya emisión estaba centrada en 660 nm, pico de emisión muy similar al de los CdSe-QDs (“core-shell”) que hemos estado tratando (3.8 nm de diámetro).

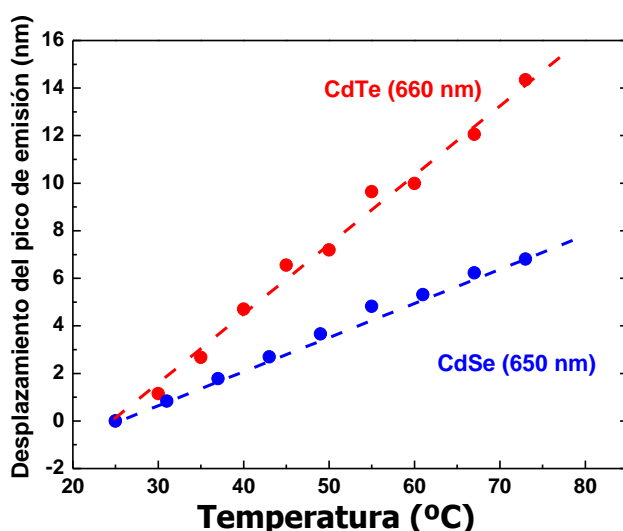


Figura 51. Variación de la posición del pico de emisión con la temperatura para los CdSe-QDs (en azul) y CdTe-QDs (en rojo). Los puntos son los datos experimentales y las líneas discontinuas constituyen los ajustes lineales correspondientes.

En la **Figura 51** podemos observar como varía el desplazamiento del pico de emisión con la temperatura para los dos tipos de QDs, con la emisión centrada aproximadamente en la misma longitud de onda (mismo tamaño de QD). Como ya se mencionó anteriormente en esta sección, mediante la **ecuación (6)**, la variación de la posición energética del primer excitón con la temperatura es el parámetro del que dependerá la variación del pico de emisión. Esta posición energética

depende de tres factores principales. Uno de ellos, el factor de red, está determinado por el tipo de material del que estén constituidos los QDs, con lo cual es lógico pensar que QDs constituidos de materiales diferentes den lugar a sensibilidades térmicas diferentes. En otras palabras, materiales semiconductores con una fuerte dependencia de su banda prohibida (gap) con el parámetro de red llevará a QDs con una mayor sensibilidad térmica. En nuestro caso, hay que tener en cuenta que para los CdTe el coeficiente de presión del gap de energía de los CdTe-QDs es mayor que para los CdSe-QDs

$$\left(\left(\frac{dE_g^0}{dP} \right) \right)_{CdTe} \approx 7.5 meV \cdot kbar^{-1} > \left(\left(\frac{dE_g^0}{dP} \right) \right)_{CdSe} \approx 4.1 meV \cdot kbar^{-1}.$$

La presencia de este término explica cualitativamente la mayor sensibilidad del CdTe-QDs de tamaños parecidos a los CdSe-QDs. Naturalmente, es también posible que el que nuestros QDs tengan una estructura distinta pueda jugar también un papel importante. Sin embargo, los CdSe-QDs presentan una mayor estabilidad en dispersiones líquidas biocompatibles, esto es, solventes tales como medio de cultivo celular y PBS en los cuales los CdTe-QDs precipitan a las pocas horas de ser dispersados. Por tanto, los CdSe-QDs serán los utilizados en la presente memoria para estudiar las aplicaciones de los QDs como nanotermómetros (ver **Capítulo 6** y **Capítulo 7**).

5.3. Influencia del tamaño en la sensibilidad térmica.

La superioridad en la sensibilidad térmica observada para los CdTe-QDs frente a los CdSe-QDs motiva la investigación que los efectos del tamaño de CdTe-QDs tienen en la sensibilidad térmica de la fluorescencia.

Como ya se comentó en el **Capítulo 2**, la sensibilidad a la temperatura de los QDs puede estar muy condicionada por las moléculas que los recubren y que actúan como funcionalización para que sean dispersables en agua. Este hecho puede ser determinante en la sensibilidad térmica de un determinado QD. Por ello se procedió a estudiar en detalle la sensibilidad térmica de los CdTe-QDs, que, como ya se detalló en el **Capítulo 4**, consistían de un núcleo de CdTe rodeado de moléculas, y que al no ser una estructura de “core-shell”, se espera que el recubrimiento tenga efectos apreciables en la compresión y dilatación del QD.

En la **Figura 52** se puede ver la dependencia del máximo de la emisión con la temperatura para CdTe-QDs de diferentes diámetros. Para CdTe-QDs con diámetros menores a 3.8 nm la dependencia de la longitud de onda de emisión con la temperatura presenta dos tendencias lineales. Para temperaturas menores a 50 °C la longitud de onda de la emisión varía linealmente con la temperatura. Sin embargo, para temperaturas mayores a 50° C esta dependencia, también lineal se incrementa en 0.4 nm/°C. La existencia de esta doble tendencia en el movimiento de la longitud de onda con la temperatura revela que la aplicación de este tipo de nanopartículas como nanotermómetros está restringida a un rango de temperaturas en el que se pueda asegurar su calibración.

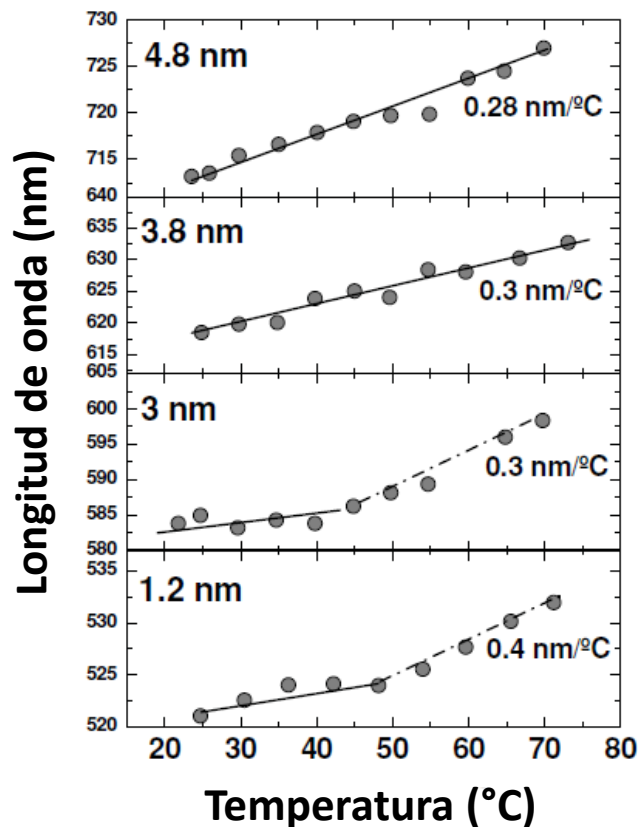


Figura 52. Dependencia del máximo de la emisión con la temperatura para CdTe-QDs de diferentes diámetros. Las líneas continuas son los mejores ajustes a los datos experimentales. La sensibilidad térmica obtenida de estos ajustes lineales se indica en cada caso.

Este comportamiento no lineal en los CdTe-QDs puede deberse, como se mencionó en la **sección 2.2.2**, al efecto que el recubrimiento tiene sobre la matriz del semiconductor y que se ve incrementado para tamaños pequeños debido al mayor ratio entre superficie y volumen.

Zhou et al sugirieron que este comportamiento no lineal podría estar causado por un crecimiento de las nanopartículas al alcanzar cierta temperatura, lo que llevaría a un desplazamiento de la longitud de onda de emisión de las mismas hacía el rojo; desplazamiento que sería irreversible. (Zhou and Zhang 2013)

Este crecimiento de las nanopartículas mostraría una histéresis en el comportamiento, que, como se puede apreciar en la **Figura 53**, no se aprecia en los ciclos de calentamiento y enfriamiento de nuestra muestra. Esta figura muestra la variación en la longitud de onda de emisión inducida por la temperatura obtenida durante los ciclos de calentamiento y enfriamiento para los CdTe-QDs de 1.2 nm de diámetro. Como se puede observar, no se aprecian cambios significativos en las longitudes de emisión durante los ciclos de calentamiento y enfriamiento, por lo cual las dos tendencias lineales diferentes se deben a un proceso que es reversible y no se debe a un crecimiento de las nanopartículas. Se puede atribuir esta doble tendencia a una modificación anómala de la expansión de la matriz del semiconductor debido al recubrimiento superficial.

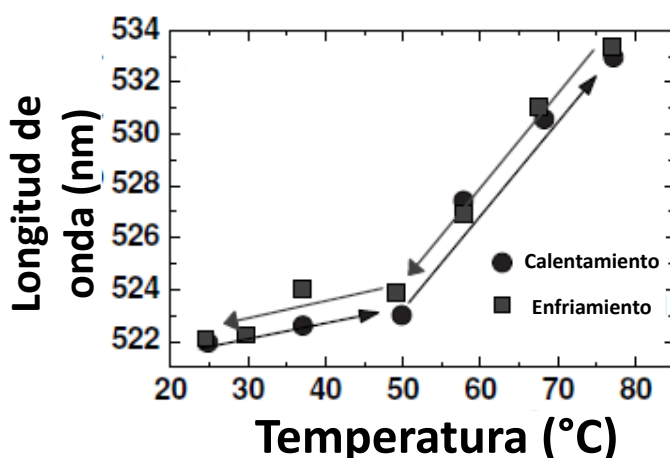


Figura 53. (a) Dependencia en temperatura del máximo de emisión obtenido para CdTe-QDs de 1.2 nm de diámetro durante el proceso de calentamiento y enfriamiento. No se observa un comportamiento histérico. (b) Espectro de emisión a temperatura ambiente correspondiente a CdTe-QDs de 1.2 nm antes y después de los ciclos de calentamiento hasta 77°C.

También es importante señalar que para todos los QDs estudiados, se encontró que los procesos de calentamiento y enfriamiento eran reversibles independientemente de si mostraban sólo una tendencia o una doble tendencia.

Por último se analizaron los desplazamientos en el pico de emisión producidos por el aumento en la temperatura del medio en el que se encontraban

(agua) de los CdTe-QDs que presentaban una única dependencia lineal con la temperatura. Los resultados, presentados en la **Figura 54**, muestran que la sensibilidad térmica es mayor para los CdTe-QDs con emisión en 660 nm, los mismos que presentaban una mayor eficiencia cuántica de fluorescencia. Con lo cual los convierten en una excelente opción para utilizar en aplicaciones de termografía.

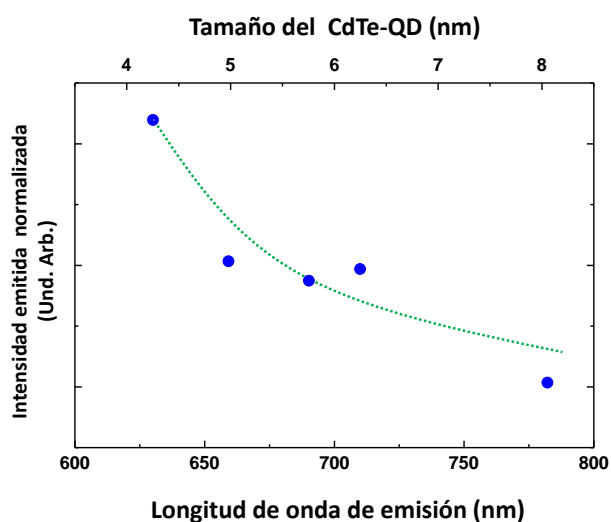


Figura 54. Sensibilidad térmica espectral de los CdTe-QDs en función del máximo de la emisión y del tamaño del QD. Los círculos son los puntos experimentales mientras que la línea discontinua es una guía para los ojos.

5.4. Termoimagen fluorescente

Una vez evaluada la respuesta termométrica de las nanopartículas, se probó su posible aplicación para la realización de imágenes térmicas mediante la fluorescencia de los QDs, esto es, su habilidad para crear mapas térmicos bidimensionales.

Para ello se realizaron experimentos en fluidos (agua) que contienen estos QDs. El primero de ellos fue un experimento de doble haz, uno que sirve como referencia y otro como excitación, en el que se creó un gradiente térmico inducido por el haz de excitación. Este gradiente térmico sirvió para obtener una imagen térmica (variación espacial de la temperatura) utilizando la dependencia térmica con la intensidad de emisión de los CdSe-QDs. Para ello se focalizó un haz láser de 980 nm (el haz de excitación) en una cubeta que contenía una solución de CdSe-QDs en PBS. Esta longitud de onda era absorbida por el agua presente en la dispersión y disipada en forma de calor. Ya que el perfil de la absorción (distribución de intensidad entorno al foco) no es homogéneo, se espera que el mayor calentamiento se encuentre en el lugar donde se focaliza el haz de excitación y que la temperatura vaya disminuyendo en el área circundante. Por lo tanto se creará un gradiente térmico en nuestra dispersión.

El haz láser de 980 nm se focalizó en un punto focal de 200 μm de diámetro. Bajo estas condiciones experimentales, la máxima densidad de potencia estimada que llegaba a nuestra solución era de $0.8\text{KW}/\text{cm}^2$. Para estas densidades de potencia, las fuerzas ópticas pueden ser despreciadas, y por lo tanto, se puede considerar que la distribución espacial de los CdSe-QDs es homogénea. (Ashkin et al. 1986) Bajo estas condiciones podemos utilizar tanto la intensidad de la luminiscencia como la posición del pico de emisión de los CdSe-QDs como parámetros para encontrar la temperatura del entorno en el que se encuentran. Para ello, la luminiscencia de los CdSe-QDs fue excitada con un láser pulsado de 100 fs a 800 nm focalizado en el mismo punto que el haz láser calentador (excitación multifotónica). Para la focalización del haz láser de 800 nm se utilizó un objetivo de microscopio (10X y $\text{NA}=0.25$) con el que se conseguía un haz de 2 μm en el punto focal. La luminiscencia de los CdSe-QDs era recogida por un espectrofotómetro para su análisis y una plataforma con movimiento bidimensional nos permitía el escaneo de la temperatura en los alrededores del

punto focal del haz de calentamiento, permitiendo de esta manera la creación del mapa térmico.

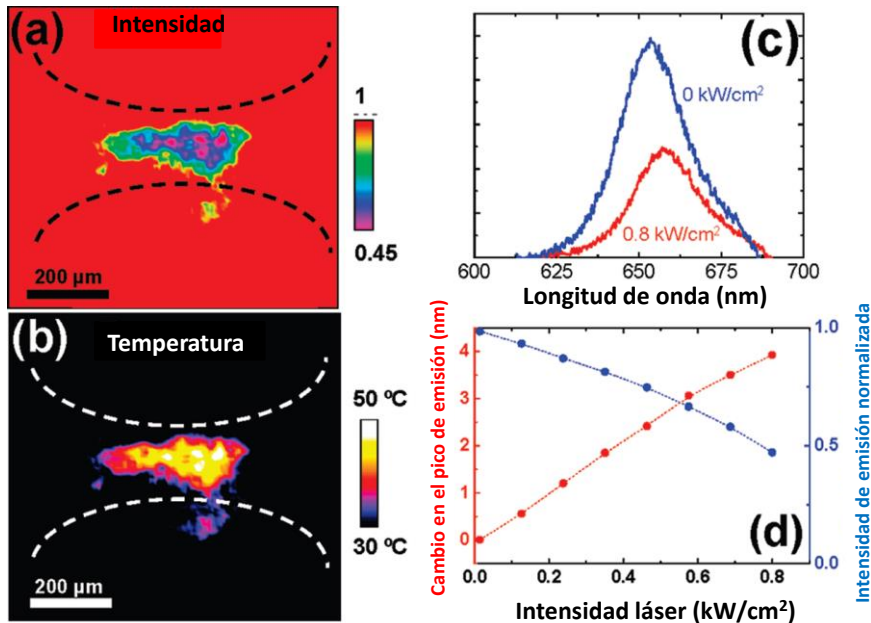


Figura 55. (a) Variación espacial de la intensidad de la emisión de los CdSe-QDs obtenida de la muestra de CdSe-QDs en PBS en la presencia de un haz láser de calentamiento a 980 nm a $0.6\text{kW}/\text{cm}^2$ (cuyo perfil espacial está esquemáticamente dibujado mediante líneas discontinuas) (b) Imagen térmica de la solución de CdSe-QDs en PBS en la que se observa un claro aumento de la temperatura en el foco del haz láser de 980 nm. (c) Espectro de emisión de los CdSe-QDs en la solución de CdSe-QDs en PBS en el foco a dos intensidades de bombeo distintas del haz de calentamiento. (d) Gráfico del cambio en la posición del pico de emisión y de la intensidad de emisión en el foco del haz de bombeo en función de la intensidad del láser calentador.

La **Figura 55(a)** muestra la distribución espacial de la intensidad de la luminiscencia de la solución de CdSe-QDs en PBS. En esta imagen, las líneas negras representan esquemáticamente el perfil espacial del haz láser de bombeo (a una potencia de $6\text{ kW}/\text{cm}^2$) en la solución de CdSe-QDs en PBS. Como puede observarse, la intensidad emitida se reduce drásticamente en el foco, lo cual traduce, de acuerdo con la calibración de la **Figura 50 (b)**, en un incremento de la temperatura en el foco, como era esperable. Los datos presentados en la **Figura 50(b)** nos permiten traducir este descenso de la intensidad en cambios en la temperatura de nuestra solución. Es más, la imagen del gradiente térmico correspondiente al descenso en la intensidad puede verse en la **Figura 55(b)**,

demostrándose que la temperatura en el foco ha subido 20°C para esta intensidad en concreto.

Debido a los largos tiempos de integración requeridos en nuestro sistema experimental durante la adquisición de los espectros de emisión para conseguir una buena relación señal/ruido (más de 10 s por espectro), la adquisición de imágenes térmicas basadas en el cambio en el pico de la emisión no es posible. Sin embargo, la temperatura de fluidos no puede obtenerse tan sólo del descenso de la intensidad de los CdSe-QDs, sino también del cambio en el pico de emisión. Para ello se midió el espectro de emisión a diferencias potencias del láser de excitación en el punto focal del haz de calentamiento. En la **Figura 55 (c)** se pueden ver dos espectros de emisión de los CdSe-QDs a dos intensidades de calentamiento. Está bien claro que a mayor potencia, menor intensidad y también hay un cambio significativo en el pico de emisión. La **Figura 55 (d)** muestra el cambio en el pico de emisión y la disminución de la intensidad de la luminiscencia en función de la intensidad del haz de calentamiento. Para la mayor intensidad utilizada en este trabajo se consiguió un cambio del pico de emisión de 3.9 nm y una reducción de la intensidad del 52%. Por tanto, el incremento de la temperatura en el foco calculada mediante la reducción de la intensidad es de 24°C mientras que mediante el método del cambio en el pico de emisión es de 20°C. En consecuencia, la discrepancia entre ambos métodos es cercana a 4°C, esto es, menor de un 20% del valor medido. La discrepancia entre los dos métodos puede deberse a fluctuaciones en la densidad de nanopartículas por las corrientes de convección debidas al gradiente de temperatura inducido en el fluido (agua). Sin embargo, la habilidad de los CdSe-QDs para generar imágenes de gradientes térmicos en fluidos está claramente demostrada.

5.5. Termometría celular.

Una vez probada la eficacia de los CdSe-QDs como nanotermómetros en medios líquidos, se quiso probar su habilidad termométrica en un sistema biológico.

Para ello se eligieron células HeLa. Las células HeLa son una línea celular inmortalizada derivada de cáncer de cuello de útero con fenotipo epitelial. Este tipo de células tiene la propiedad de poder dividirse indefinidamente *in vitro* si cuentan con los nutrientes y el espacio para deshacerse de los desechos necesarios. Este tipo de línea celular ha sido muy investigada por su gran resistividad a condiciones adversas. (Masters 2002) Además, estas células tienen otro aspecto a resaltar por el cual fueron elegidas para nuestro estudio. Estas células derivan de un tipo de tumor que es completamente accesible a la irradiación externa con láser.

Primeramente se estudió la toxicidad de los CdSe-QDs en estas células. Para ello se incubó durante diferentes periodos de tiempo (2 horas y 18 horas) una solución de CdSe-QDs en PBS a diferentes concentraciones, y se estudió la viabilidad celular mediante el método de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Este método consiste en una manera de medir no radioactivamente la citotoxicología, proliferación o viabilidad. MTT es una sal de tetrazolio de color amarillo y soluble en agua. Metabólicamente las células activas son capaces de convertir este colorante en un formazán mediante la reducción del anillo de tetrazolio, como se puede ver en la **Figura 56** (Mosmann 1983). Los cristales de formazán pueden ser disueltos en un solvente orgánico como el dimetilsulfóxido, (DMSO, CH_3SOCH_3) y su abundancia puede ser cuantificada midiendo la extinción de la solución a 540 nm. El valor resultante de la medida de la absorbancia de formazán en DMSO está relacionado con el número de células vivas.

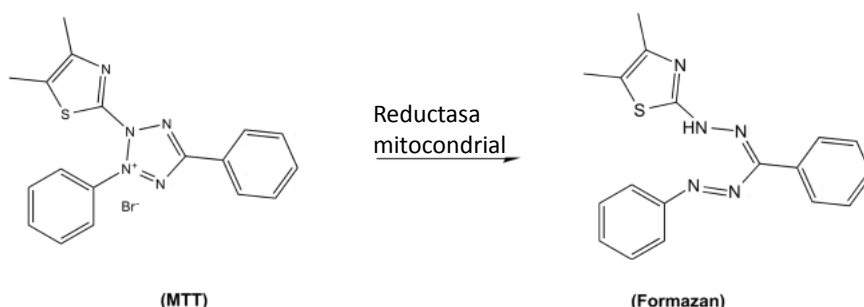


Figura 56. Esquema de la reacción de reducción del MTT en formazán.

En nuestro caso, para determinar la viabilidad de las células incubadas con CdSe-QDDs se cultivaron células HeLa en una placa con 24 pocillos a 39°C en una atmósfera al 5% de CO₂. Tras 48 horas de incubación el medio de cultivo en el pocillo fue reemplazado por una dispersión de CdSe-QDs en PBS en distintas concentraciones y las células fueron incubadas diferentes periodos de tiempo. Tras la incubación, el medio con CdSe-QDs fue retirado y se añadieron 0.5 ml de MTT a cada pocillo (0.05mg/ml de MTT de Sigma). Tras 2 horas de incubación, el medio fue retirado y los cristales de formazán fueron disueltos en 0.5 ml de DMSO. La extinción de la muestra a 540 nm se tomó con un espectrofotómetro fluor4 (TECAN) que lee placas de pocillos y se ajustó el cero para medio sin células. La viabilidad celular relativa relacionada con las células de control que contenían medio sin nanopartículas se toma como 100%.

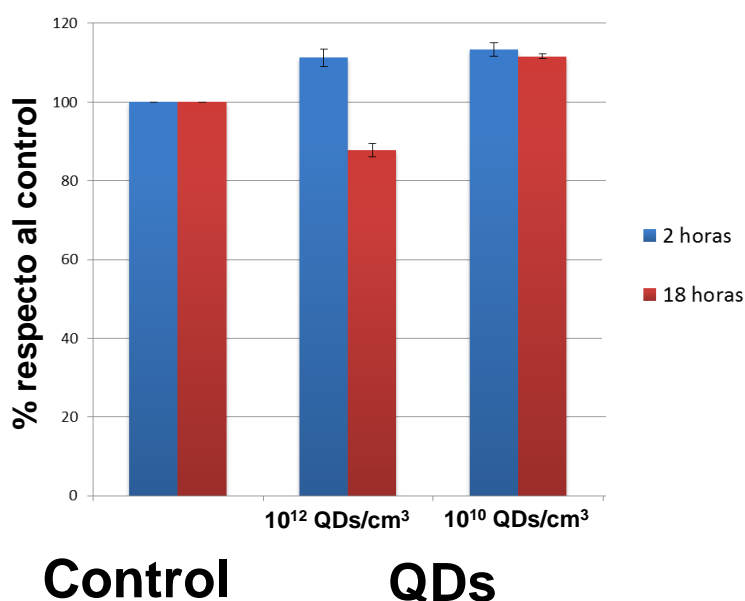


Figura 57. Viabilidad de células medida por el método MTT de células HeLa incubadas con CdSe-QDs a distintas concentraciones y con distintos tiempos de incubación.

En la **Figura 57** podemos observar los resultados del ensayo MTT para dos concentraciones de CdSe-QDs y dos tiempos de incubación en células HeLa. Como podemos ver, para tiempos de incubación bajos (2 horas), el porcentaje de células vivas incubadas con CdSe-QDs es incluso mayor que en el control, con lo cual podemos decir (dentro del error experimental) que estas nanopartículas no parece que influyan negativamente en la proliferación celular. Una situación similar ocurre al incubar las células periodos más largos de tiempo a concentraciones bajas (10^{10} QDs/cm³); sin embargo, para concentraciones más altas y tiempos de incubación más largos (18 horas), las nanopartículas sí que suponen un problema para la viabilidad celular, reduciendo el porcentaje de células activas hasta el 90%, porcentaje que es suficientemente alto como para considerar que este tipo de nanopartículas no son tóxicas, en las concentraciones y tiempos referidos.

Tras el estudio de la toxicidad celular se procedió a comprobar que las CdSe-QDs se internalizaban dentro de las células, para ello se incubaron células HeLa con una solución de CdSe-QDs en PBS a una concentración de $2 \cdot 10^{12}$ CdSe-QDs/cm³ durante dos horas. Tras la incubación se obtuvo una imagen mediante un microscopio multifotónico (Zeiss LSM510), de tal manera que varias células

pueden verse en la misma imagen. La **Figura 58** muestra las imágenes ópticas de transmisión (columna de la izquierda), la imagen de fluorescencia (columna del medio) y la superposición de ambas imágenes (columna derecha) de un grupo de células HeLa incubadas en ausencia (línea superior) y presencia (línea inferior) de CdSe-QDs. La excitación se realizó con radiación láser de 800 nm mientras que se recogió la emisión de 650 nm.

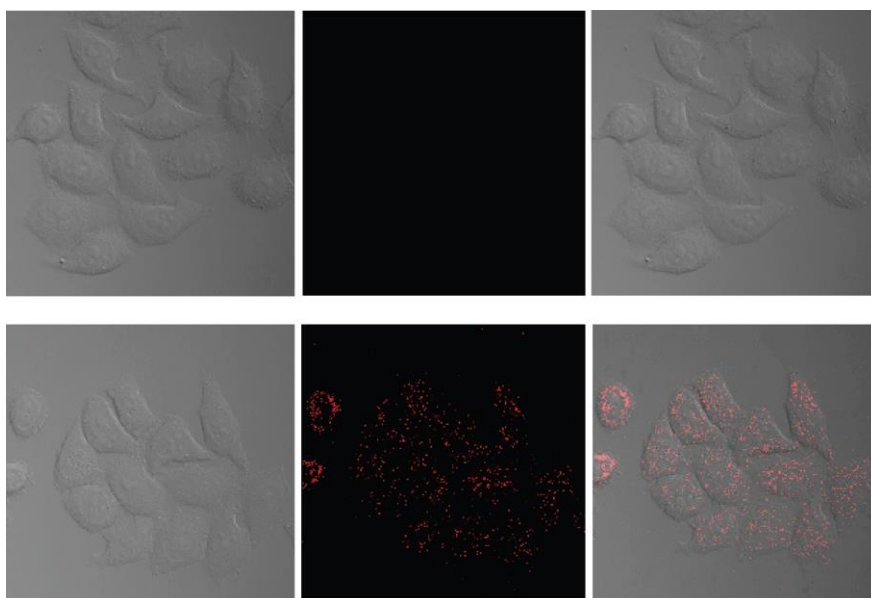


Figura 58. Imágenes ópticas de transmisión a temperatura ambiente de células HeLa no incubadas (línea superior) e incubadas (línea inferior) con CdSe-QDs en PBS. (Columna izquierda) imágenes ópticas de transmisión; (Columna del medio) imágenes de fluorescencia a dos fotones; (Columna derecha) Superposición de las imágenes ópticas con las de fluorescencia.

Una vez demostrada la internalización de las nanopartículas procedimos a evaluar su habilidad para detectar cambios en la temperatura celular; para ello la temperatura celular fue variada externamente con un flujo de aire, como se puede ver esquemáticamente en la **Figura 59**.

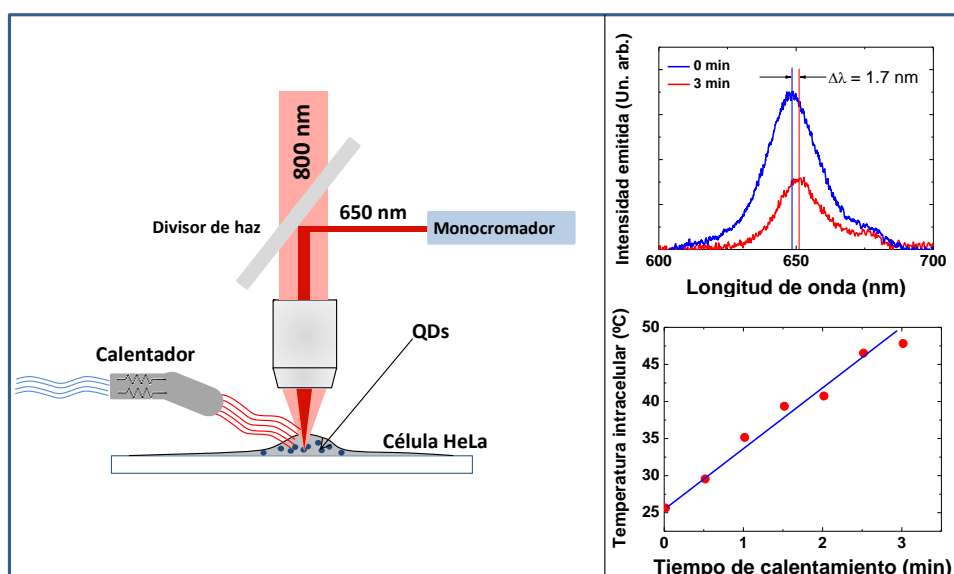


Figura 59. (Parte izquierda) Diagrama esquemático del montaje experimental utilizado para monitorizar la temperatura intracelular mediante termometría fluorescente excitada a dos fotones con CdSe-QDs durante el calentamiento de células vivas. (Derecha arriba) Espectro de fluorescencia obtenido tras la excitación a dos fotones de los CdSe-QDs incorporados a células HeLa a dos tiempos de calentamiento diferentes. (Derecha abajo) Temperatura intracelular calculada del desplazamiento del pico de emisión de los CdSe-QDs obtenido a diferentes tiempos de calentamiento.

Como era de esperar, se obtiene un cambio evidente en la posición del pico de emisión de los CdSe-QDs con el tiempo de calentamiento. Esto se puede observar claramente al ver cómo cambia el espectro de emisión de los CdSe-QDs según va pasando el tiempo (ver la **Figura 59** que muestra el espectro antes de empezar el calentamiento y tras tres minutos de calentamiento). En estos experimentos, la radiación láser de excitación de 800 nm se focalizó dentro de las células utilizando un objetivo de microscopio de 100X (NA= 0.9) conduciendo a un punto focal de 0.5 μm . La temperatura intracelular sufría un claro ascenso observable en el cambio en el pico de emisión de los CdSe-QDs. Mediante el análisis de los espectros de emisión a diferentes tiempos de calentamiento, y la calibración de la temperatura de la **Figura 50**, nos fue posible la medida de la temperatura en tiempo real. Los resultados de este experimento se muestran en la **Figura 59**, donde se puede ver la temperatura intracelular medida por nuestros nanotermómetros en función del tiempo de calentamiento. Se puede observar un incremento de la temperatura de 25°C (de los 25°C a los 50°C). Debido a la configuración experimental, incrementos de temperatura mayores llevaban a

distorsiones en el fluido que rodea las células y, por tanto, los resultados no son fiables. Sin embargo, estos resultados prueban la habilidad de los CdSe-QDs para funcionar como nanotermómetros biocompatibles para imágenes fluorescentes obtenidas bajo excitación a dos fotones. Este aumento de la temperatura era capaz de producir la muerte celular.

5.6. Nanotermómetros para imagen *in vivo*.

En principio, al utilizar QDs emisores de luz visible para aplicaciones de bioimagen, hay dos factores importantes a tener en cuenta. El primero es la eficiencia cuántica del QDs, que, como vimos en la **sección 5.1**, experimenta un máximo para QDs emitiendo en longitudes de onda situadas en el visible. El segundo factor a tener en cuenta es que el rango espectral de la detección de los microscopios multifotónicos comerciales está limitado, a día de hoy, a la región visible del espectro electromagnético. Sin embargo, el uso de QDs emitiendo en el visible limita las posibles aplicaciones *in vivo*, debido a la limitación en la profundidad de penetración de la radiación visible en los tejidos. Esta limitación está causada por la presencia de componentes en los tejidos que absorben radiación visible, tales como el agua, la melanina o la hemoglobina. (Frangioni 2003) Este hecho, en combinación con los efectos de scattering óptico inherente a las fluctuación de densidad de los distintos tejidos, lleva a que el coeficiente de extinción sea superior a 20 cm^{-1} en el visible, llevando a longitudes de penetración menores a $500 \mu\text{m}$. (Marquez et al. 1998)

Para incrementar la longitud de penetración, uno de las soluciones que podemos encontrar es utilizar QDs que emitan en el infrarrojo cercano (longitudes de onda mayores a 700 nm , esto es, en la ventana biológica de penetración en los tejidos). A su vez, el que los QDs se exciten mediante un proceso multifotónico (en el que la longitud de onda de excitación sea mayor que la de emisión) asegura una buena resolución espacial del proceso de imagen. (Sargent 2005) Sin embargo, por otra parte, cualquier proceso de excitación multifotónico es menos eficiente que los procesos de excitación a un fotón. De cualquier modo el uso de radiación en la primera ventana biológica ($700\text{-}900 \text{ nm}$) nos permite unas longitudes de penetración mayores y también minimiza el riesgo de fotodisociación del cadmio, lo cual minimizaría la toxicidad de los QDs. (Mortensen et al. 2008)

Por tanto, para cualquier QD será útil en términos de resolución en profundidad y resolución espacial para bioimagen, que se cumplan las dos siguientes condiciones simultáneamente:

- Tanto las longitudes de onda de excitación como emisión deben comprenderse en la ventana biológica ($700\text{-}900 \text{ nm}$)

- La fluorescencia debe ser producida por procesos multifotónicos (excitación a energías menores que la emisión), a fin de obtener una alta resolución espacial.

En la literatura se pueden encontrar ejemplos de QDs utilizados como marcadores bioluminiscentes; sin embargo, en estos trabajos sólo uno de los requisitos arriba mencionados se cumplía, no los dos simultáneamente. Por ejemplo, en el trabajo de Shuhendler se conseguían imágenes a gran profundidad en tejidos (del orden de 20 mm) utilizando QDs híbridos (PbSe embebidos en éster graso), excitando y emitiendo simultáneamente en la ventana biológica pero sin excitación multifotónica. (Shuhendler et al. 2011) Esto permite alcanzar grandes profundidades pero limita la resolución espacial de las imágenes. Por otra parte, existen otros trabajos realizados mediante excitación multifotónica, pero en los que tanto la excitación como la emisión se realizaban en el visible, con lo cual, conducían a escasas profundidades de penetración en tejidos. (Cai et al. 2006, Hama et al. 2007)

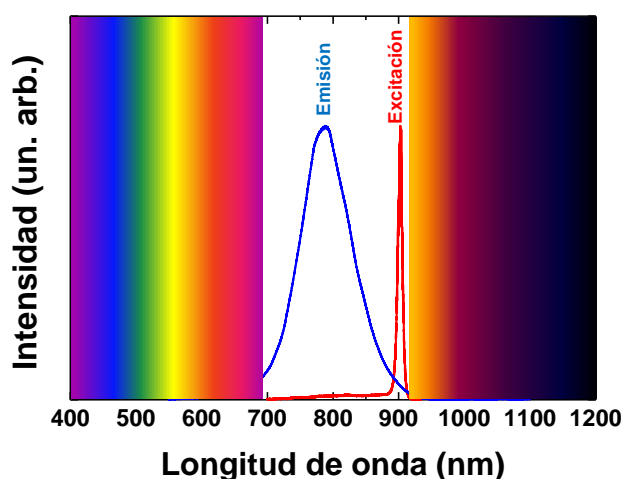


Figura 60. Espectro de emisión de los CdTe-QDs de 7.3 nm de diámetro al ser excitados con un láser de titanio zafiro en modo pulsado a 100 fs por pulso y 900 nm. El espectro correspondiente al láser de excitación también está incluido así como una representación esquemática de la ventana biológica.

Por tanto, procedimos a la adquisición de imágenes en profundidad utilizando QDs de CdTe (7.3 nm de diámetro, emisión a 780 nm) que satisfacen los dos requerimientos arriba mencionados; el primero, nuestros QDs se excitaban y

emitían en la ventana biológica, como se puede ver en la **Figura 60** y, para el segundo, comprobamos que la dependencia de la emisión a 800 nm en función de la potencia de excitación a 900 nm, es una dependencia no lineal (excitación multifotónica) y que conduce a una mejor resolución espacial que la excitación a un fotón (ver **Figura 61**)

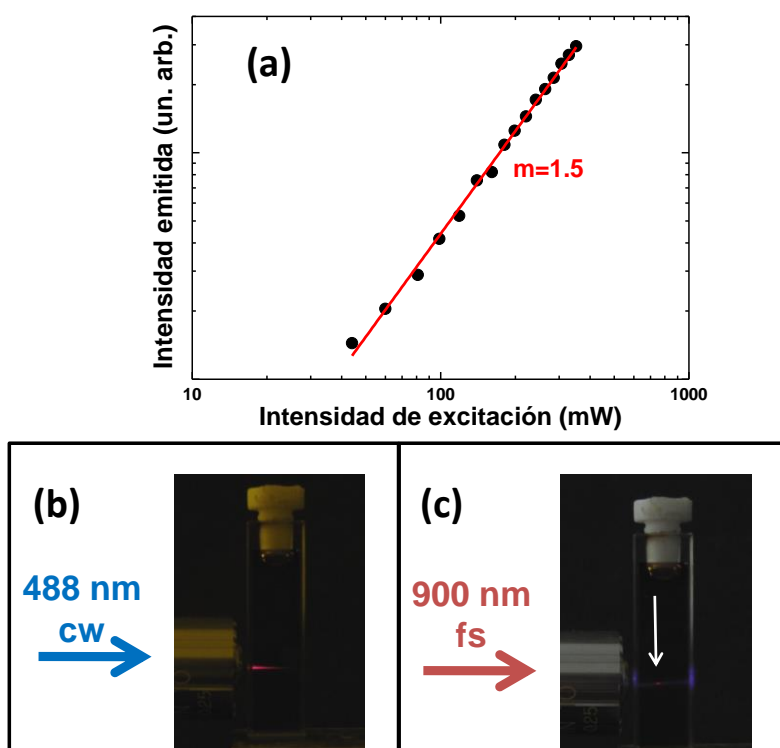


Figura 61. (a) intensidad del pico de emisión de los CdTe-QDs en función de la intensidad de excitación a 900 nm. Los puntos son los datos experimentales mientras que la línea es el ajuste lineal. (b) Imagen óptica de la solución de CdTe-QDs al ser excitada con un haz láser continuo a 488 nm focalizado en la solución. (c) Imagen óptica de la solución de CdTe-QDs al ser excitada con un haz láser de 900 nm pulsado y focalizado en la solución. La flecha indica dónde se encuentra la luminiscencia (en el punto focal del objetivo).

Los estudios de penetración en tejidos animales se llevaron a cabo con un tejido sintético. Este tejido sintético mimetiza las propiedades ópticas de los tejidos animales, de manera que no es necesario utilizar tejidos animales reales durante los experimentos.

El tejido sintético utilizado en nuestros experimentos fue fabricado con un medio que presenta un fuerte scattering (agar) y componentes absorbentes, como el aceite de oliva y la tinta china.(Flock et al. 1992, Madsen et al. 1992, Di Ninni et al. 2010) El espectro de extinción del tejido sintético utilizado se puede ver en la **Figura 62 (a)**. Observando la gráfica incrustada, podemos ver cómo el espectro de extinción mimetiza, no sólo la absorción de la hemoglobina, sino también el fondo debido al scattering.

Para el estudio de la longitud de penetración en tejidos de la luminiscencia de los CdTe-QDs se utilizó un microscopio confocal, como el que se detalló en el **Capítulo 4**. La radiación láser de 900 nm se focalizó en una cubeta que contenía la solución de CdTe-QDs en agua con un objetivo de larga distancia de trabajo de 50X (NA=0.65). La luminiscencia de los CdTe-QDs fue recogida con el mismo objetivo y conducida, tras pasar por varias aberturas confocales, a un espectrómetro. Las imágenes bidimensionales se obtuvieron mediante un barrido del microscopio de excitación/recolección. Encima de la cubeta se colocaron tejidos sintéticos de diferentes grosores.

Como se puede ver en la **Figura 62 (b)**, a pesar de que la intensidad de la emisión recogida decae drásticamente con el espesor del tejido sintético, se puede apreciar intensidad luminosa proveniente de los CdTe-QDs hasta una profundidad de 1.6 mm. A estas profundidades de penetración se pueden conseguir imágenes de fluorescencia *in vivo* de venas, carcinoma y también del cortex y del hipocampo.(Jeongkyu et al. 2008, Jiang et al. 2008)

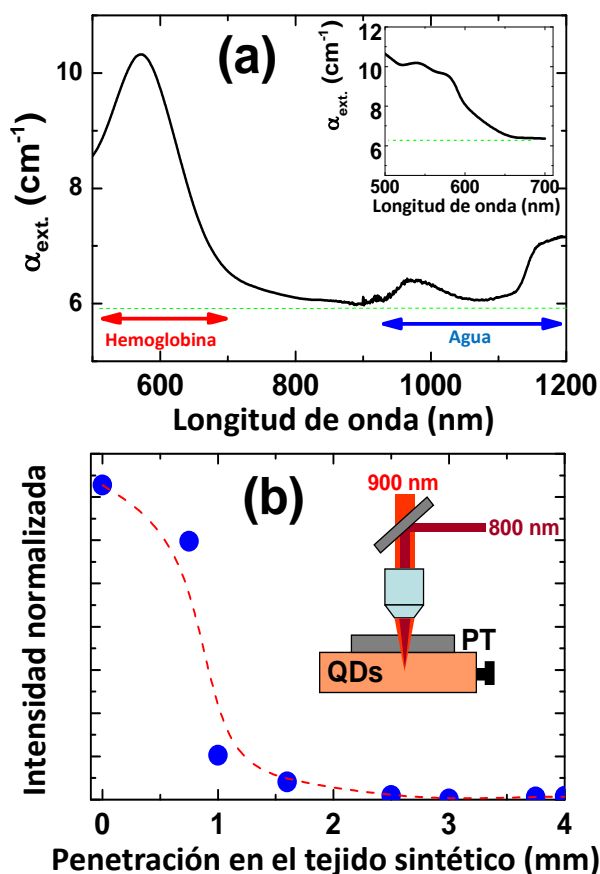


Figura 62. (a) Coeficiente de extinción del tejido sintético utilizado en este trabajo. La gráfica incrustada corresponde al coeficiente de extinción encontrado por Kobayashi y colaboradores de tejido animal. Es importante resaltar que el tejido sintético reproduce tanto el fondo de scattering como la absorción en el visible debida a la hemoglobina. (b) Intensidad de la fluorescencia de los CdTe-QDs (a 800 nm) excitada de manera multifotónica (900 nm) tras atravesar tejidos sintéticos de distintas profundidades. También se puede ver un esquema del experimento. (Kobayashi et al. 2001)

Tras este estudio, procedimos a la obtención de una imagen bidimensional en profundidad mediante excitación multifotónica. Para ello colocamos encima de una cubeta de cuarzo que contenía la dispersión de CdTe-QDs en agua, un tejido sintético de 1.5 mm de espesor. Entre la cubeta y el tejido se colocó una lámina transparente en la que el acrónimo de la universidad (UAM) fue impreso (las letras eran transparentes y el fondo negro), como se puede ver en el esquema de la Figura 63.

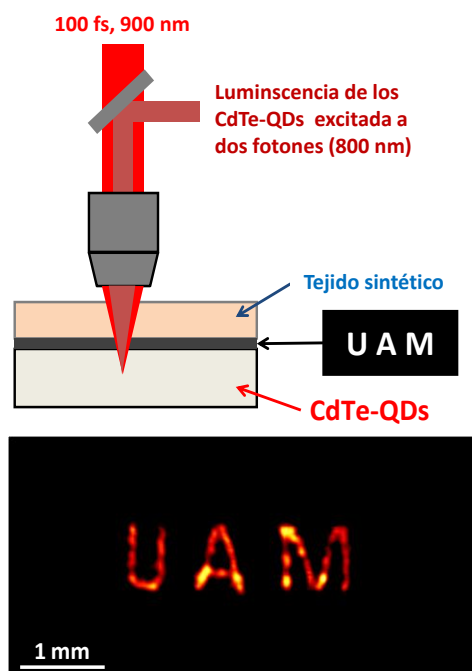


Figura 63. Diagrama esquemático del montaje experimental utilizado para obtener imágenes en profundidad utilizando la emisión excitada a dos fotones en el infrarrojo de CdTe-QDs. En la parte baja de la figura aparece la imagen en profundidad obtenida.

La excitación pulsada de 900 nm estaba focalizada en la solución de CdTe-QDs y se recogía la emisión de los QDs a través de la lámina y el tejido sintético por el mismo objetivo, llevándose a un espectrómetro (no representado en la figura) para su análisis. Con un barrido del objetivo por la muestra, se obtuvo la imagen inferior de la **Figura 63**. A la vista de dicha imagen, se puede concluir que con este tipo de nanopartículas se puede conseguir imágenes bidimensionales de gran resolución espacial y en profundidad de tejidos similares a los tejidos animales.

Conclusiones.

En el presente capítulo se ha estudiado sistemáticamente la emisión luminiscente de CdTe-QDs de distintos tamaños motivados, por la pregunta de existía un tamaño específico que maximizaría la eficiencia cuántica de las nanopartículas, encontrándose que sí que existe un tamaño óptimo para aplicaciones de bioimagen, correspondiente a un diámetro de 3.8 nm y una emisión de 660 nm, explicándose, además, el origen de dicho tamaño.

Una vez encontrado este tamaño óptimo se llevaron a cabo estudios del cambio de las propiedades luminiscentes de CdSe-QDs de tamaño óptimo con la temperatura; esto es, posición del pico de emisión, intensidad del pico de emisión y tiempo de decaimiento y también posición del pico de absorción, en función de la temperatura. Se ha encontrado que algunas de estas propiedades luminiscentes sufren cambios con la temperatura, de manera que estas nanopartículas pueden ser utilizadas como nanotermómetros luminiscentes. Además, hemos demostrado que, para la obtención de imágenes térmicas, es preferible utilizar la variación del pico de emisión con la temperatura, ya que este parámetro no queda afectado por posibles variaciones de concentración de nanopartículas en la región a estudio.

Además, se ha comparado la sensibilidad térmica del desplazamiento del pico de emisión para dos tipos de QDs comerciales, tanto de CdSe como de CdTe, emitiendo en longitudes de onda próximas, encontrándose que los CdTe-QDs son más sensibles a la temperatura que los CdSe-QDs. Sin embargo, debido a su mayor estabilidad en dispersión acuosa (dada su estructura de “núcleo-corteza”), los CdSe-QDs son, por el momento, una mejor opción para aplicaciones biológicas.

La sensibilidad térmica de los CdSe-QDs nos ha permitido la obtención de imágenes de gradientes térmicos en fluidos, así como la medida de la temperatura intracelular durante procesos de calentamiento con una fuente externa.

Finalmente, y con la idea de estudiar posibles nanotermómetros que funcionen en la ventana biológica, se han estudiado QDs de CdTe de diámetro grande (7.3 nm). Hemos observado que dichos QDs permiten conseguir bioimágenes bidimensionales a una profundidad cercana a los 2 mm. La emisión

de estos QDs está centrada cerca de los 800 nm y se excitan de forma multifotónica a 900 nm, con lo que tanto la excitación como la emisión están dentro de la ventana biológica. La excitación multifotónica permite una mayor resolución espacial, muy importante en las aplicaciones de bioimagen.

6. Nanocalentadores.

Introducción

Como ya se mencionó en el **Capítulo 1**, en los últimos años, y a pesar de los buenos resultados obtenidos con las nanopartículas magnéticas para tratamientos de hipertermia, se ha despertado un creciente interés en la investigación de nanopartículas capaces de generar calor tras ser iluminadas con luz láser. (Jaque Garcia et al. 2014)

La utilización de radiación láser en este tipo de terapias está limitada por los problemas relacionados con la absorción de la luz por parte de los tejidos animales; la absorción de la luz es contraproducente ya que aumenta la temperatura en todo el área iluminada de forma no selectiva, y, además, se impide el tratamiento de regiones no superficiales debido a la escasa penetración en tejidos animales de la radiación óptica.

Sin embargo, estos problemas se pueden minimizar si se utilizan longitudes de onda dentro de regiones espectrales en las que se minimice la atenuación de la luz, es decir que se minimiza, tanto la absorción como la dispersión de la luz por los tejidos. Estas regiones espectrales se conocen como “ventanas biológicas”.

Como ya se trató en el **Capítulo 1**, tradicionalmente dos regiones espectrales cumplían las condiciones de alta penetración en tejidos animales; las llamadas primera (desde 700 hasta 950 nm, I-BW) y segunda (desde 1000 hasta 1350 nm, II-BW) ventanas biológicas (Jaque Garcia et al. 2014).

La utilización de láseres que emitan en regiones espectrales dentro de las ventanas biológicas, junto con la utilización de nanopartículas capaces de convertir esta radiación electromagnética en calor, permite la selectividad de las terapias fototérmicas.

Para conseguir una gran eficiencia y selectividad en la terapia fototérmica utilizando nanopartículas, éstas deben cumplir varios requisitos:

- Poseer una gran sección eficaz de absorción en una región espectral incluida dentro de dichas ventanas biológicas. Esto asegura una eficiente absorción de la radiación óptica, que combinada con una alta eficiencia de conversión de la luz en calor hace posible la

realización de terapia térmica a bajas intensidades de iluminación.(Albota et al. 1998)

- Baja toxicidad. Para minimizar los efectos secundarios, la toxicidad de las nanopartículas utilizadas en terapia fototérmica sólo debería presentar un problema para las células en el momento de la terapia y ser inocuas tanto para las células cancerosas como para las sanas en ausencia de excitación óptica.(Teeguarden et al. 2007)
- Fácil funcionalización. La funcionalización permitirá el tratamiento selectivo de tumores, ya que, gracias a ella, la recepción de las nanopartículas será específica de las células diana a tratar.(Nikolic et al. 2006, Shi et al. 2007)
- Buena dispersión en líquidos biocompatibles. La buena dispersión en líquidos biocompatibles es esencial para asegurar una buena circulación por el torrente sanguíneo y, consecuentemente, un fácil acceso a las células que han de ser tratadas.(Yu et al. 2006, Jana et al. 2007)

A día de hoy, y gracias a la investigación en síntesis de nanopartículas, hay disponible una gran variedad de nanocompuestos que satisfacen los requerimientos indicados anteriormente. Estas nanopartículas pueden ser clasificadas en diferentes familias: metálicas, de semiconductores, de cristales dopados con tierras raras, de carbono y orgánicas.

En este capítulo se estudiarán la posibilidad de utilizar los dos tipos distintos de nanopartículas (nanopartículas de oro y nanotubos de carbono) cuyas características básicas han sido descritas en el **Capítulo 3** como nanocalentadores para terapia fototérmica.

Primero se estudiará la influencia de la geometría de nanopartículas de oro en su eficiencia de calentamiento. Tras encontrar la geometría más eficiente, se procederá al estudio de la eficiencia de calentamiento de este tipo de geometría como nanocalentador en las dos ventanas biológicas variando sus dimensiones para conseguir distinta frecuencia de resonancia del plasmón superficial. Por último, se estudiarán los nanotubos de carbono como nanocalentadores; estudiándose su eficiencia de calentamiento a distintas longitudes de onda de

excitación aprovechando que, para este tipo de material el coeficiente de extinción se mantiene básicamente constante en el rango espectral de las ventanas biológicas.

6.1. Nanocalentadores basados en nanopartículas de oro.

Entre las variedades de nanopartículas capaces de convertir eficientemente la luz en calor, las nanopartículas metálicas, y entre ellas las de oro, han sido las más populares, sobre todo debido a su carácter multifuncional. Las nanopartículas de oro se utilizaron inicialmente como marcadores biológicos fluorescentes a nivel celular y como buenas sondas ópticas para imágenes por “scattering”; ahora el interés en ellas se ha incrementado como agentes de terapia térmica. En este apartado se estudiará tanto la influencia de la geometría en la eficiencia de calentamiento de nanopartículas de oro como la influencia de su excitación en longitudes de onda pertenecientes a la primera o a la segunda ventana biológica.

6.1.1. Eficiencia de calentamiento. Influencia de la geometría de las nanopartículas.

Como ya se explicó en el **Capítulo 3**, tanto la fluorescencia como las propiedades calentadoras de las nanopartículas de oro están basadas en la resonancia del plasmón superficial (SPR) que corresponde a la oscilación colectiva de los electrones libres de la superficie del metal. Una resonancia de plasmón superficial es inducida cuándo una nanopartícula de oro es iluminada por una radiación electromagnética a una determinada longitud de onda, la denominada longitud de onda de resonancia de plasmón superficial (λ_{SPR}). Cuando una nanopartícula de oro es iluminada a su λ_{SPR} se genera calor debido a la relajación de las corrientes superficiales. Como hemos visto en el **Capítulo 3**, la localización espectral de la λ_{SPR} depende de las dimensiones y forma geométrica de la nanopartícula (Ahmed and Goldberg 2004). Esto una gran ventaja de este tipo de nanopartículas, ya que, mediante una adecuada elección de su morfología, se puede conseguir que presenten su λ_{SPR} en la región espectral deseada.

La eficacia de los tratamientos fototérmicos viene dada por la densidad de nanopartículas incorporadas en el sistema, la intensidad de la excitación láser y la eficiencia de calentamiento de las nanopartículas; esto es, la fracción (por nanopartícula) de potencia laser que es convertida en calor. (Wang et al. 2005, Huang et al. 2006, Maestro et al. 2010).

Pese a su gran interés y a la cantidad de trabajos publicados en los últimos años sobre terapia fototérmica utilizando nanopartículas de oro, la influencia de la morfología en la eficiencia de calentamiento es un área poco estudiada en la que sólo se pueden encontrar trabajos teóricos (Jain et al. 2006). Debido a esto, decidimos, en primer lugar, estudiar la eficiencia de calentamiento para las morfologías más destacables de nanopartículas de oro, todas ellas con su λ_{SPR} en la primera ventana biológica, más concretamente a 808 nm, longitud de onda de especial interés, tanto por poseer una gran penetración en tejidos animales como por la existencia de láseres comerciales de bajo coste que facilitarían y abaratarían las terapias fototérmicas. (Jaque Garcia et al. 2014)

Para el estudio sistemático de las eficiencias de calentamiento de distintos tipos de nanopartículas en la presente tesis doctoral se ha desarrollado un método completamente nuevo, el método de doble haz, cuyos detalles experimentales se han discutido en el **Capítulo 4**.

Las morfologías a estudio, cuyas dimensiones, síntesis y funcionalizaciones superficiales fueron discutidas en el **Capítulo 4** son las siguientes: nano cáscaras de oro (gold nanoshells, GNSs), nano bastoncillos de oro (gold nanorods, GNRs), nano dados de oro (gold nanocages, GNCs) y nanoestrellas de oro (gold nanostars, GNSts); estas últimas se dividen dependiendo de la longitud de sus brazos, en cortas (GNSts-s) y largas (GNSts-l).

Los tipos de nanopartículas arriba indicadas se dispersaron en agua destilada a las concentraciones indicadas en la **Tabla 5**. Todas las dispersiones presentaron un comportamiento coloidal estable durante meses.

Geometría	Dimensiones	[Au] gr/NP	[GNPs] NPs/cm ³	$\alpha_{cal}(808\text{ nm})$ cm ⁻¹	$\sigma_{cal}(808\text{ nm})$ cm ²	Φ_{abs}	$\sigma_{abs}(808\text{ nm})$ cm ²	$\sigma_{cal}(808\text{ nm})$ cm ²	$\sigma_{abs}(808\text{ nm})/[Au]$ cm ² /gr
GNRs	8±1 nm width 29±5 nm length	2.8·10 ⁻¹⁷	1.3·10 ¹¹	5.9	4.5·10 ⁻¹¹	0.95±0.04	4.3·10 ⁻¹¹	2.0·10 ⁻¹²	1.5·10 ⁰
GNSt-l	38±4 nm core 9±3x46±6 nm lobes	1·10 ⁻¹⁵	9·10 ¹⁰	4	4.4·10 ⁻¹¹	1.02±0.03	4.4·10 ⁻¹¹	0	4.4·10 ⁴
GNSt-s	36±4 nm core 6±3x13±3 nm lobes	5.4·10 ⁻¹⁶	13·10 ¹⁰	2	1.5·10 ⁻¹¹	0.43±0.05	6.4·10 ⁻¹²	8.4·10 ⁻¹²	1.2·10 ⁴
GNCs	47±3 nm edge 4±1 wall thickness	4.7·10 ⁻¹⁶	0.8·10 ¹⁰	4	5.0·10 ⁻¹⁰	0.63±0.02	3.1·10 ⁻¹⁰	1.9·10 ⁻¹⁰	7·10 ⁵
GNSs	120±5 nm Si-core 10±1 nm shell	1·10 ⁻¹⁴	1.3·10 ¹⁰	2	1.5·10 ⁻¹¹	0.68±0.03	10·10 ⁻¹¹	5.0·10 ⁻¹¹	1·10 ⁴

Tabla 5. Dimensiones y parámetros ópticos de interés de los cinco tipos de nanopartículas de oro investigadas ($\lambda_{SPR}=808\text{ nm}$).

En la **Figura 64** podemos ver los espectros de extinción normalizados de los cinco tipos de nanopartículas de oro estudiados en este apartado. Como puede observarse, los coeficientes de extinción presentan un máximo cercano a 808 nm para los cinco tipos de nanopartículas, (λ_{SPR}).

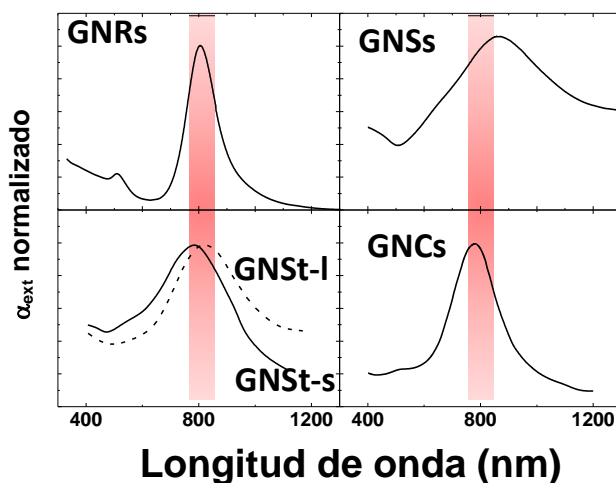


Figura 64 Espectros de extinción normalizados de las dispersiones de nano cáscaras de oro (gold nanoshells, GNSs), nano bastoncillos de oro (gold nanorods, GNRs), nano dados de oro (gold nanocages, GNCs) y nanoestrellas de oro (gold nanostars, GNSts-s y GNSts-I)

Para las medidas de eficiencia de calentamiento de las distintas nanopartículas de oro, los CdSe-QDs (que actúan como nanotermómetros) discutidos en el **Capítulo 5** fueron añadidos a las dispersiones acuosas de las nanopartículas metálicas (nanocalentadores), de tal manera que la concentración final de CdSe-QDs ($4 \times 10^9 \text{ cm}^{-3}$) era lo suficientemente baja para no modificar el espectro de extinción de ninguna de las nanopartículas de oro (los dados en la **Figura 64**). Así pues, la solución obtenida será una mezcla de nanocalentadores con nanotermómetros. Esta mezcla de nanopartículas de oro con CdSe-QDs fue introducida en un microcanal de 200 μm de espesor y 2 mm de largo (de Ibidi Inc.). El microcanal fue colocado, a su vez en el microscopio de doble haz descrito en la **sección 4.2.3**.

La muestra, para conseguir su calentamiento, fue excitada con un láser de fibra monomodo operando en modo continuo a 808 nm mediante un objetivo 50

X de larga distancia de trabajo con una apertura numérica de 0.55, lo que hacía que la cintura del haz láser fuera de $0.88 \mu\text{m}$.

Como se estudió en detalle en la **sección 4.2.3**, la eficiencia de calentamiento se puede determinar fácilmente la eficiencia de calentamiento de las nanopartículas a partir del ajuste lineal de los datos experimentales $\frac{\Delta T_f}{\alpha_{ext}}$

versus P_l siguiendo la ecuación:

$$\phi = m \frac{2 \cdot \pi \cdot K}{\ln \left[\frac{D}{w_l} \right]} \quad (38)$$

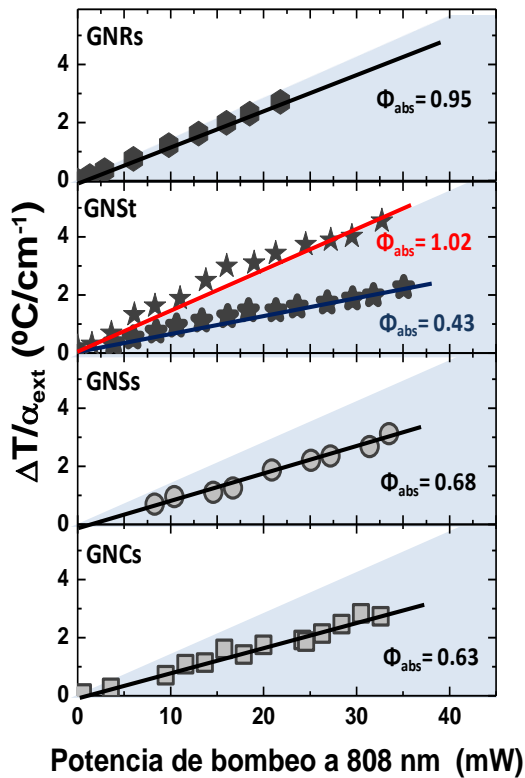


Figura 65. Dependencia del incremento de la temperatura (normalizado por el coeficiente de extinción) en el foco con la potencia láser incidente (a 808 nm) para nanopartículas de oro con distintas geometrías. Los puntos son los datos

experimentales mientras que las líneas son los ajustes lineales. Las áreas sombreadas indican los márgenes con significado físico, esto es, correspondientes a eficiencias de calentamiento entre 0 y 1.

La **Figura 65** muestra la dependencia de $\frac{\Delta T_f}{\alpha_{ext}}$ con la potencia láser, para los cinco tipos de nanopartículas estudiadas en este trabajo. En todos los casos se puede observar una dependencia lineal, en acuerdo con la **ecuación (32)**. Esto nos sugiere que el coeficiente de extinción a 808 nm de las dispersiones no se modifica durante el proceso de calentamiento ni tampoco su eficiencia de calentamiento. Como se mencionó anteriormente, el coeficiente de extinción de las dispersiones depende de la concentración de nanopartículas y de su sección eficaz de extinción. La concentración local de nanopartículas en el punto focal podría variar debido a fenómenos de atrapamiento óptico (Zhang et al. 2006, Selhuber-Unkel et al. 2008). Selhuber-Unkel et al, estimaron que el atrapamiento óptico de GNRs puede ocurrir para intensidades láser por encima de los $2 \cdot 10^6$ W/cm² (Selhuber-Unkel et al. 2008). Sin embargo, en nuestro caso, la máxima potencia láser utilizada, 40 mW, se corresponde a una intensidad de $2 \cdot 10^5$ W/cm², un orden de magnitud por debajo del mínimo requerido para conseguir atrapamiento óptico de nanopartículas de oro. Por tanto, en nuestro sistema no se espera que el atrapamiento óptico tenga lugar y, por tanto, que la concentración de nanopartículas en el foco varíe durante el proceso de calentamiento. Este atrapamiento podría dar lugar a una acumulación de nanopartículas calentadoras en el foco, con lo cual la eficiencia de calentamiento medida no sería la correspondiente a la concentración de la dilución original, sino la correspondiente a una concentración más alta. Otro aspecto a tener en cuenta, ya que podría dar lugar a curvas no lineales de $\frac{\Delta T_f}{\alpha_{ext}}$ con la potencia láser, es el cambio de morfología de las nanopartículas. Este se espera que ocurra cuando la temperatura suba por encima alrededor de los 70°C. Sin embargo, en nuestros experimentos no se sobrepasaron los 40°C, con lo que estábamos muy por debajo de la temperatura límite para el cambio de morfología. (Mohamed et al. 1998, Hironobu et al. 2006, Carbó-Argibay et al. 2007, Zijlstra et al. 2009). Por tanto, podemos decir que de acuerdo a la observación experimental de tendencias lineales, no se esperaban cambios en la sección eficaz de extinción durante el

proceso de medida, lo que indica la validez del proceso de medida de la eficiencia de calentamiento.

En la **Figura 65** se han incluido unas áreas sombreadas que corresponden a aquellas con significado físico, esto es, correspondientes a valores de eficiencia de calentamiento entre 0 y 1. En todos los casos, excepto en el de las GNSt-I, los datos experimentales se encuentran contenidos en este rango. Para el caso de las GNSt-I, algunos de los datos experimentales se encuentran ligeramente por encima de este rango; sin embargo, la diferencia entre estos puntos y los valores esperables para $\Phi = 1$ está, para todos los valores, contenida dentro del error de los datos experimentales. Por ello se puede considerar la eficiencia de absorción $\Phi \simeq 1$ para las GNSt-I.

Las eficiencias de absorción se encontraron mediante un ajuste lineal de los datos experimentales y aplicando la **ecuación (34)**. Los resultados se pueden ver tanto en la **Figura 65** como en la **Tabla 5**.

Para los GNRs, la eficiencia de absorción encontrada, $95 \pm 4\%$, para GNRs con su $\lambda_{SPR} = 808 \text{ nm}$ y relación ancho-largo similar se encuentran muy cercanas a otras estimadas para GNRs por otros métodos, como espectroscopia fotoacústica (Wang et al. 2013). También es importante resaltar que el valor de la eficiencia de calentamiento obtenido experimentalmente para los GNRs, $\lambda_{SPR} = 808 \text{ nm}$, está en acuerdo con los resultados obtenidos por simulaciones numéricas para este tipo de GNRs mediante el método DDA. El método de DDA, llamado así por las siglas en inglés de Aproximación de Dipolos Discretos, es un método numérico en el cual el objeto interactuante con la luz se reproduce geométricamente por una red cúbica de N dipolos individuales. ($N=38500$, en nuestras simulaciones (Maestro et al. 2012)). Usando el código desarrollado por Draine et al, se han calculado las contribuciones de las secciones eficaces absorción, scattering a la de extinción. Observando la **Figura 66**, en la que se pueden ver estos cálculos, es fácil ver que $Q_{abs}=0.91Q_{ext}$, y que, por tanto, la eficiencia de absorción obtenida de las simulaciones es del 91%, como podemos ver, muy cercana a la encontrada experimentalmente. (Bruce T. Draine 2012, Maestro et al. 2012)

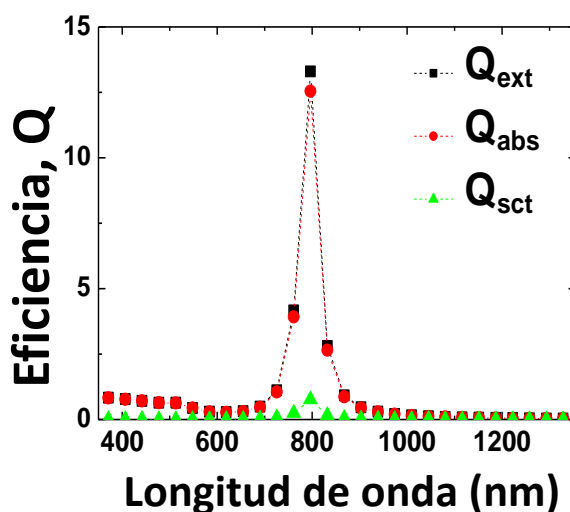


Figura 66. Secciones eficaces absorción, scattering y extinción divididas por el área efectiva de los GNRs en función de la longitud de onda simuladas mediante el método de DDA.

Para las nanoestrellas de oro (GNSts), como podemos observar en la **Figura 65**, la eficiencia de absorción depende fuertemente de la morfología. Para las GNSt-I (largas) la eficiencia de absorción es prácticamente del 100% mientras que para las GNSt-s (cortas) baja hasta $45 \pm 5\%$. Para entender estos resultados se compararon con otros encontrados en la literatura. En todos los casos, las estrellas más puntiagudas (GNSt-I) tienen eficiencias de absorción más elevadas. (Rodríguez-Oliveros and Sánchez-Gil 2012, Yuan et al. 2012). En las nanoestrellas de oro (GNSts) tenemos dos plasmones; el plasmón localizado en los brazos, cuya morfología sería más parecida a un GNR y el localizado en la parte central de la estrella, cuya morfología sería la de una esfera. Consecuentemente, para los GNSt-s la contribución de la morfología esférica es más importante que en las GNSt-I, por lo que es esperable que su eficiencia de absorción sea mucho más baja ya que sería más parecida a la de las nanocáscaras de oro (GNSs). La alta eficiencia de absorción de las GNSt-I las hace excelentes candidatas para terapias de fototerapia que utilicen nanopartículas.

Para las nanocáscaras de oro (GNSs), la eficiencia de absorción encontrada, como se puede ver en la **Figura 65** y en la **Tabla 5**, es del $68 \pm 3\%$. Esta eficiencia puede ser comparada con predicciones teóricas realizadas por Jain et al, (Jain et al. 2006) quienes habían calculado la eficiencias de absorción para GNSs con un

núcleo de silicio de 50 nm de radio y una cáscara de oro de 10 nm, es decir, de dimensiones muy similares a las de nuestras GNSs. Para estas dimensiones, se calculó que $\lambda_{SPR}=890$ nm, que, observando la **Figura 64**, está muy próxima a la que encontramos experimentalmente en las GNSs utilizadas (con $\lambda_{SPR} = 870$ nm). Según el trabajo de Jain et al, la eficiencia de absorción calculada es de 64%, muy cercana a la encontrada experimentalmente en este trabajo.

En el trabajo de Hessel et al (Hessel et al. 2011) se compara experimentalmente la eficiencia de absorción de GNSs con la de GNRs, ambos excitados a 800 nm, encontrándose que la eficiencia de absorción de los GNSs es 0.6 veces la de los GNRs. En nuestro caso el cociente entre eficiencias de absorción es de 0.7, hecho que se puede deber a la diferencia de tamaño entre las nanopartículas utilizadas o incluso a la diferente longitud de onda de excitación. Esta es otra prueba de que nuestros resultados experimentales se encuentran en consonancia con otros resultados publicados con anterioridad.

En la **Figura 65** se puede observar que la eficiencia de absorción de los nanodados de oro (GNCs) es de $63\pm 2\%$. Buscando en la literatura se han podido encontrar simulaciones de eficiencias de absorción con resultados que van desde el 40% al 100%. Estos valores tan dispares se deben a la gran influencia que tiene las propiedades geométricas concretas (longitud, espesor, relación ancho/largo del vértice) de estas nanopartículas en sus propiedades ópticas. En estos trabajos se puede ver que para un espesor de la pared de unos 5 nm la eficiencia de absorción decrece según aumenta la longitud de la pared del dado. (Chen et al. 2005, Hu et al. 2006, Cho et al. 2009). Para nuestro caso particular (4 nm de grosor y 47 nm de largo), y según estos cálculos, se esperaba una eficiencia cercana al 70%, es decir, un 7% mayor a la encontrada experimentalmente. El que la eficiencia de absorción determinada experimentalmente en este trabajo sea menor puede deberse a las desviaciones con la geometría en las que se basan las simulaciones.

Cabe destacar que, entre todas las geometrías estudiadas, los nanodados (GNCs) presentan la eficiencia de absorción más baja, que es también lo que encontraron en sus simulaciones Hu et al, (Hu et al. 2006) al comparar numéricamente la eficiencia de absorción de GNRs, GNSs y GNCs, todas ellas con $\lambda_{SPR} = 800$ nm.

Una vez determinada las eficiencias de absorción, es posible determinar las secciones eficaces tanto de scattering como de absorción a partir de la sección eficaz de extinción determinada experimentalmente. De acuerdo las **ecuaciones (14) y (15)**, tendremos:

$$\sigma_{abs} = \phi \cdot \sigma_{ext} \quad (39)$$

Y

$$\sigma_{scat} = (1 - \phi) \cdot \sigma_{ext} \quad (40)$$

Los resultados encontrados para las secciones eficaces de absorción, extinción y scattering para cada tipo de nanopartícula se pueden ver en la **Tabla 5**. El mayor valor de sección eficaz de absorción se encuentra para los GNCs y GNSs, para ambos casos está en el orden de 10^{-10} cm^2 por nanopartícula.

Para aplicaciones *in vivo*, es muy deseable mantener al mínimo la cantidad de oro total que se incorpora al organismo; de esta manera se podría minimizar sus posibles efectos secundarios. Por ello, es importante que la nanopartícula que se vaya a utilizar en el tratamiento fototérmico tenga una gran sección eficaz de absorción por nanopartícula, junto con una masa reducida. Este dato, masa de oro por nanopartícula ([Au]), está también incluido en la **Tabla 5** y, basándonos en estos datos, se han estimado la sección eficaz de absorción por gramo de oro ($\sigma_{scat}/[\text{Au}]$). Los mayores valores de esta cantidad corresponden a los GNRs, seguidos, bastante de cerca, por los GNCs, ambos en el orden de los $10^6 \text{ cm}^2/\text{g}$. Este hecho, junto con la excelente eficiencia de incorporación de los GNRs en las células cancerosas encontrado en la literatura, (Wang et al. 2013) sugiere que estas nanopartículas son las más prometedoras para realizar una terapia fototérmica altamente eficiente y poco invasiva (Wang et al. 2013).

6.1.2. Eficiencia de los GNRs en las ventanas biológicas.

En la **sección 6.1.1** se estudiaba la influencia de la geometría en la eficiencia de calentamiento para nanopartículas de oro de distintas geometrías con SPR en torno a 800 nm, encontrándose que una de las geometrías más eficientes era la

de los nano bastoncillos de oro (gold nanorods, GNRs). Además, los GNRs presentaban una mayor sección eficaz de absorción por masa por nanopartícula. Probablemente por esta razón, estas nanopartículas han sido ampliamente utilizadas para tratamientos de terapia fototérmica tanto *in vitro* como *in vivo*. (Kuo et al. 2010)

Los GNRs ofrecen, además, la posibilidad de sintonización de su λ_{SPR} mediante la selección de las dimensiones específicas. De hecho es posible encontrar muchas compañías que proporcionan GNRs con la λ_{SPR} variando desde los 700 nm hasta los 1100 nm, esto es, tanto en la primera como en la segunda ventana biológica.

En esta sección, analizamos la eficiencia de absorción de distintos tipos de GNRs comerciales cuyas λ_{SPR} están o bien en la primera o bien en la segunda ventana biológica, contrastando los resultados experimentales con predicciones teóricas.

Los GNRs estudiados fueron proporcionados por la compañía Nanorods LLC y estaban funcionalizados con Bromuro de cetiltrimetilamonio (conocido como CTAB), lo que los hacía dispersables en agua. En el **Capítulo 4** se mostraron las imágenes de TEM de estos GNRs, de las cuales podíamos deducir sus dimensiones, que eran de $7 \times 28 \text{ nm}^2$ para los que presentaban su $\lambda_{SPR} = 808 \text{ nm}$, a los que llamaremos cortos (o GNRs-s) y $16 \times 77 \text{ nm}^2$ para los que presentaban su $\lambda_{SPR} = 1020 \text{ nm}$, a los que llamaremos largos (o GNRs-l). De sus imágenes de TEM, presentadas en la **Figura 32**, se ve que tanto para los GNRs-s como para los GNRs-l la relación entre el ancho y el largo (lo que en la literatura se conoce como “aspect ratio”) es de 4.

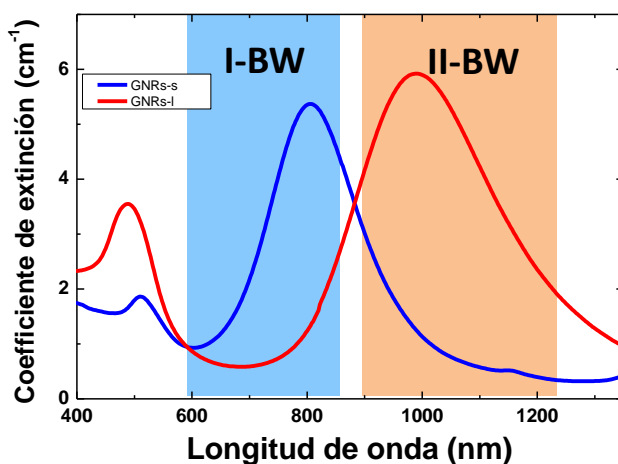


Figura 67. Espectros de extinción de las dispersiones de nano bastoncillos de oro (gold nanorods, GNRs), cortos (GNRs-s) y largos (GNRs-l). En azul está sombreado la parte del espectro electromagnético correspondiente a la primera ventana biológica (I-BW) y en naranja a la segunda ventana biológica (II-BW). En ambos casos se ha sustraído la contribución del agua.

En la **Figura 67** se encuentran los espectros de extinción de las dispersiones en agua de GNRs-s y GNRs-l utilizadas en esta parte de la tesis. Las concentraciones eran similares, $1.3 \cdot 10^{11}$ nanopartículas por cm^{-3} para los GNRs-s y de $1.0 \cdot 10^{11}$ nanopartículas por cm^{-3} para los GNRs-l, de acuerdo con las especificaciones de la casa comercial que los suministró. En azul está sombreada la parte del espectro electromagnético correspondiente a la primera ventana biológica (I-BW) y en naranja la correspondiente a la segunda ventana biológica (II-BW). En ambos casos la contribución del agua al espectro de extinción ha sido sustraída. Se pueden ver claramente, en cada caso, dos máximos en el coeficiente de extinción correspondientes a la resonancia de plasmón superficial tanto transversal como longitudinal. También puede observarse como la λ_{SPR} (la correspondiente al plasmón longitudinal) se mueve desde la primera a la segunda ventana biológica, al pasar de los nanobastoncillos cortos a los largos.

Como ya se explicó en la **sección 6.1.1**, para las medidas de eficiencia de calentamiento de los dos tipos de GNRs mencionados, los CdSe-QDs discutidos en el **Capítulo 5** fueron añadidos a las dispersiones acuosas que ya contenían las nanopartículas calentadoras de oro (para hacer de nanotermómetros), de tal

manera que la concentración final de CdSe-QDs ($2 \times 10^9 \text{ cm}^{-3}$) no modificaba el espectro de absorción de ninguno de los nanocalentadores.

La mezcla de GNRs con CdSe-QDs fue introducida en un microcanal de $200 \mu\text{m}$ de espesor y 2 mm de largo (de Ibidi Inc.). El microcanal fue colocado, a su vez en el microscopio de doble haz descrito en la **sección 4.2.3**.

La muestra, para conseguir su calentamiento, fue excitada con un láser de fibra monomodo (operando en modo continuo a 808 nm) mediante un objetivo $50 \times$ de larga distancia de trabajo con una apertura numérica de 0.55 , lo que hacía que el diámetro del haz láser fuera de $0.88 \mu\text{m}$.

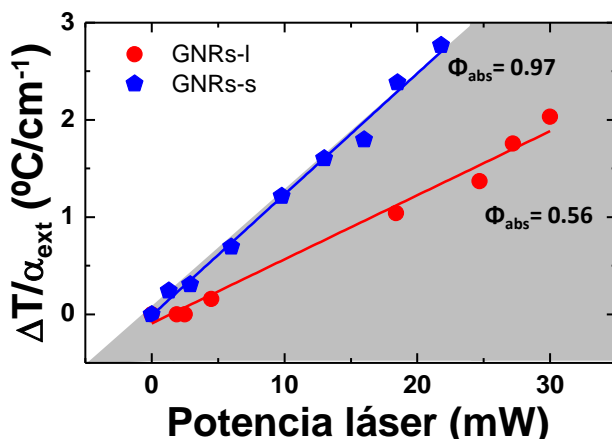


Figura 68. Dependencia del incremento de temperatura en el foco normalizada por el coeficiente de extinción a 808 nm con la potencia láser incidente (a 808 nm) para los GNRs-s y GNRs-I. Los puntos son los datos experimentales mientras que las líneas son los ajustes lineales. El área sombreada indica la zona de valores con significado físico, esto es, correspondientes a eficiencias de calentamiento entre 0 y 1 .

En la **Figura 68** se muestra la dependencia del cociente $\frac{\Delta T_f}{\alpha_{ext}}$ con la potencia láser obtenido para los GNRs-s y GNRs-I. Para ambos casos se puede observar una dependencia lineal, en acuerdo con la **ecuación (32)**. Este resultado, como en el caso de la **sección 6.1.1**, nos sugiere que el coeficiente de extinción de las dispersiones a 808 nm no se veía modificado durante el proceso de calentamiento.

Como puede observarse, nuestros datos experimentales corresponden a la región sombreada con significado físico (eficiencias entre 0 y 1). De los ajustes lineales obtenemos unas eficiencias de 0.97 ± 0.03 para los GNRs-s y de 0.56 ± 0.06 para los GNRs-l. El resultado para los GNRs-s, cercano a la unidad, se corresponde con el encontrado en la **sección 6.1.1**, lo que hace que, para este tipo de GNRs, todo el espectro de extinción corresponda a absorción de la radiación incidente y el scattering sea prácticamente despreciable.

El valor más bajo, obtenido para los GNRs-l revela que desplazar la λ_{SPR} de la primera a la segunda ventana biológica, manteniendo constante el “aspect ratio” (en nuestro caso siendo este cociente de aproximadamente 4), lleva a una reducción apreciable de la eficiencia de absorción. Nos preguntamos ahora si existe una dependencia, de carácter más general, de la eficiencia de calentamiento con la longitud de onda del plasmón longitudinal. Para ello determinamos las eficiencias de absorción de distintos GNRs un recubrimiento superficial distinto a la de los dos anteriores y con distintas dimensiones. En concreto estudiamos otras cuatro muestras de GNRs de otra compañía (Nanopartz) funcionalizados de manera distinta con polímeros hidrofílicos para hacerlos dispersables en agua. Las λ_{SPR} correspondientes a estos GNRs eran de 808, 900, 980, y 1090 nm, con unos tamaños promedio de 48x10, 67x12, 69x14 y 98x15 nm² respectivamente, como se comentó en la **sección 4.1.2.1.1**.

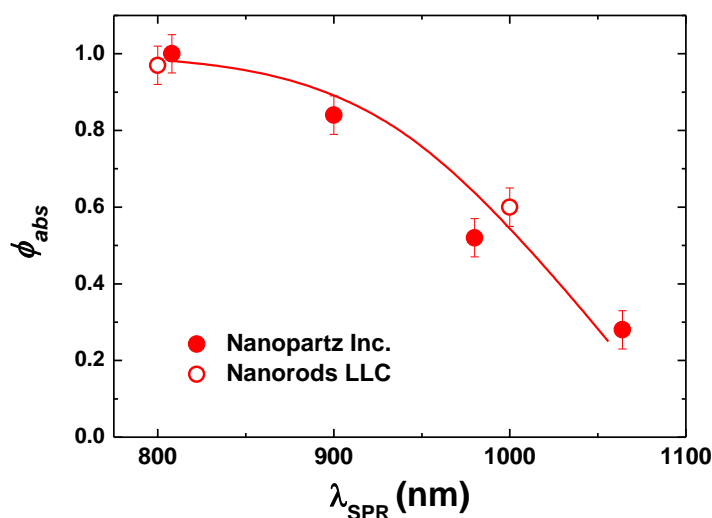


Figura 69. Eficiencia de absorción de distintos GNRs (sintetizados por Nanorods y NanoPartz) en función de su correspondiente longitud de onda de plasmón superficial. Los puntos son los datos experimentales mientras que la línea continua sólo actúa como una guía para los ojos.

La **Figura 69** muestra los valores de la eficiencia de absorción obtenidos para los diferentes tipos de GNRs (suministrados por las casas comerciales Nanopartz y NanoRod) en función de su correspondiente longitud de onda de plasmón superficial longitudinal. En esta figura se observa un hecho relevante; independientemente de la casa comercial que los proporciona (distinto tipo de recubrimiento superficial) y del cociente entre el ancho y el largo, se observa una tendencia general. Según la λ_{SPR} aumenta hacia longitudes de onda mayores, la eficiencia de absorción disminuye desde una eficiencia cercana a 1, para el caso de los GNRs cuya $\lambda_{SPR} = 808 \text{ nm}$, hasta un 0.3, para los GNRs con su $\lambda_{SPR} = 1090 \text{ nm}$. En otras palabras esto significa que la eficiencia de calentamiento va disminuyendo paulatinamente, (según la línea dibujada en la **Figura 70**) al moverse de la primera a la segunda ventana biológica. La mencionada **Figura 70** puede, por tanto, servir para estimar experimentalmente la eficiencia de absorción (calentamiento) a partir del espectro de extinción.

Comparando el valor de la eficiencia de absorción obtenido experimentalmente para los GNRs-I con simulaciones numéricas basadas en el

método 3DSIE, se observa que la eficiencia de absorción también disminuye un 30% (respecto a la de los GNRs-s).

6.2. Nanocalentadores basados en nanotubos de carbono.

A parte de las nanopartículas de oro que se han discutido en la **sección 6.1**, existen muchos otros tipos de nanopartículas que están siendo utilizadas también en terapia fototérmica (es decir como nanocalentadores)(Jaque Garcia et al. 2014). Entre ellas cabe destacar los nanotubos de carbono (CNTs), de los que se espera obtener una buena eficiencia fototérmica. Tal como se mencionó en la **sección 3.3**, los nanotubos de carbono son estructuras cilíndricas de grafeno con diámetros que van desde los cientos de nanómetros hasta unas pocas micras de longitud. Dependiendo de su estructura, como se vio en la **sección 3.3** (longitud y diámetro del tubo) los nanotubos de carbono se clasifican en dos categorías: nanotubos de carbono de una sola pared (Single-Walled carbon nanotubes, SWCNTs), que consisten en cilindros de una sola lámina de grafeno y nanotubos de carbono con varias paredes (Multi-Walled carbon nanotubes, MWCNTs) que contienen varios nanotubos concéntricos.(Sinha and Yeow 2005, Ji et al. 2010)

Los MWCNTs han demostrado una biocompatibilidad excelente y presentan una eficiente distribución por el torrente sanguíneo en las aplicaciones *in vivo*.(Zhou et al. 2009, Robinson et al. 2010, Welsher et al. 2011) Además, mediante el uso de estas nanopartículas se han obtenido excelentes resultados en terapias de ablación láser de tumores o de transporte selectivo de medicamentos.(Ghosh et al. 2009, Levi-Polyachenko et al. 2009) Todos estos trabajos han sido realizados utilizando varias fuentes de excitación láser (desde 808 nm hasta 1.1 μm) sin seguir un criterio claro .Pese a los buenos resultados obtenidos en estos trabajos, no queda claro si el uso de alguna longitud de onda en particular podría llevar a una optimización de los tratamientos de fototermia. De hecho, como para cualquier tipo de nanopartícula, es esperable que la eficiencia del tratamiento fototérmico mediante MWCNTs sea dependiente de la longitud de onda utilizada, ya que dependerá tanto de la eficiencia de calentamiento de los MWCNTs como de la penetración de la luz en los tejidos. En esta sección estudiaremos como varía la eficiencia de calentamiento de los MWCNTs para distintas longitudes de onda dentro de la primera y la segunda ventana biológica.

Para las medidas de eficiencia de calentamiento, se han utilizado MWCNTs fabricados por la casa comercial Plasmachem. Estos fueron dispersados en agua destilada a una concentración de 0.015% en peso. Las imágenes de TEM de estas nanopartículas se encuentran en la **sección 4.1.3**.

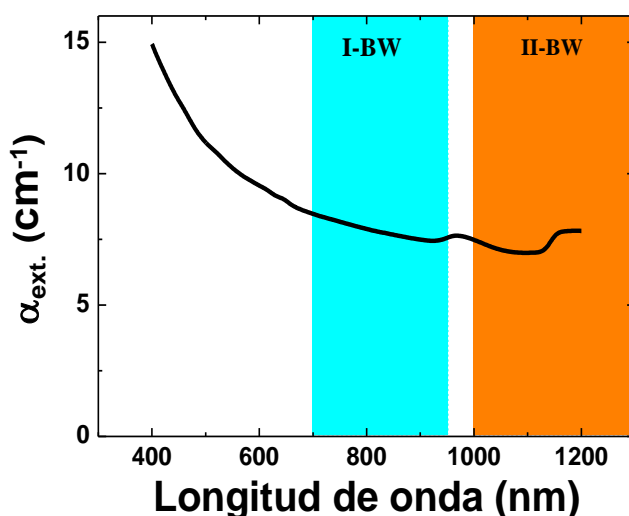


Figura 70. Espectro de extinción de la dispersión de nanotubos de carbono (MWCNTs) al 0.015% en peso, utilizados en este trabajo. En azul está sombreado la parte del espectro electromagnético correspondiente a la primera ventana biológica (I-BW) y en naranja el correspondiente a la segunda ventana biológica (II-BW). La contribución del agua no ha sido restada.

El espectro de extinción de la dispersión acuosa de MWCNTs se puede observar en la **Figura 70**. Como se puede ver, el coeficiente de extinción en las ventanas biológicas es básicamente constante, con tan sólo un pequeño incremento para longitudes de onda más cortas debido a la dispersión de la luz. Es importante recalcar que, a dicho espectro de extinción, no se le ha sustraído la contribución del solvente, agua en nuestro caso.

Debido a que no se ha reportado luminiscencia para MWCNTs se puede asumir, en una aproximación de primer orden, que toda la energía óptica absorbida se convierte en calor, permitiendo que podamos aproximar la eficiencia de calentamiento a la de absorción, como en el caso de los GNRs.

Ya que el coeficiente de extinción se mantiene básicamente constante en el rango espectral de las ventanas biológicas, sería esperable que la eficiencia de absorción también lo fuera. Debido a ello, estudiaremos la eficiencia de absorción para tres longitudes de onda distintas; una en la primera ventana biológica, 808 nm, otra en la segunda, 1090 nm y otra entre ambas ventanas biológicas, a 980 nm (donde se produce absorción del agua).

Como ya se explicó en la **sección 6.1.1**, para las medidas de eficiencia de calentamiento, los nanotermómetros de CdSe-QDs discutidos en el **Capítulo 4** fueron añadidos a las dispersiones acuosas, de tal manera que la concentración final de CdSe-QDs ($2 \times 10^{10} \text{ cm}^{-3}$) no modificaba el espectro de extinción de las nanopartículas calentadoras de carbono (MCNTs), las cuales se encontraban a una concentración de 0.015% en peso, con lo que el espectro de extinción seguía siendo el mismo que el de la figura **Figura 70**.

Para conseguir su calentamiento, la muestra fue excitada con tres láseres de fibra monomodo operando en modo continuo a las tres longitudes de onda a estudio: 808 nm, 980 nm y 1090 nm y el haz laser fue enfocado sobre la muestra, mediante un objetivo 50 X de larga distancia de trabajo con una apertura numérica de 0.55, lo que hacía que la cintura del haz láser fuera de 0.88 μm , 1.06 μm y 1.19 μm , respectivamente.

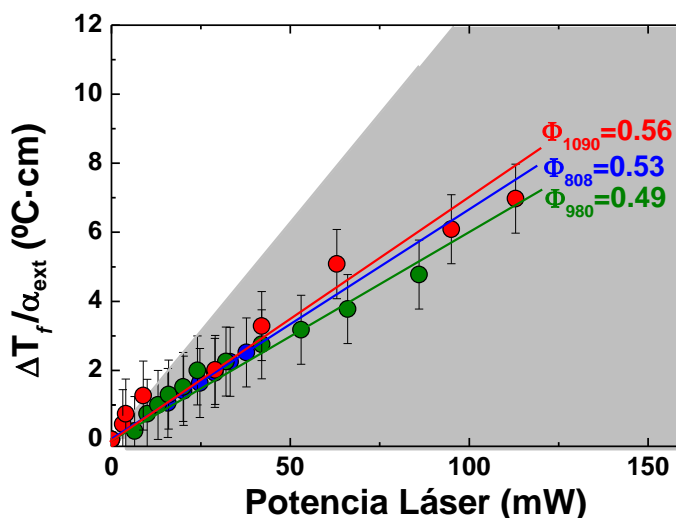


Figura 71. Dependencia del incremento de temperatura en el foco normalizada por el coeficiente de extinción (con la potencia láser incidente (a las tres longitudes de onda de estudio, 808 nm, 980 nm y 1090 nm) para los MWCNTs. Los puntos son los datos experimentales mientras que las líneas continuas corresponden a los ajustes lineales. El área sombreada indica las condiciones con significado físico, esto es, correspondientes a eficiencias de calentamiento entre 0 y 1.

En la **Figura 71** se presentan los resultados experimentales para determinar la eficiencia de absorción de los MWCNTs a las tres longitudes de onda de estudio; obteniéndose 0.53 ± 0.05 para 808 nm, 0.49 ± 0.05 para 980 nm y 0.56 ± 0.05 para 1090 nm. Por lo tanto, teniendo en cuenta la incertidumbre experimental, podemos decir que, para el rango espectral entre 800 nm y 1100 nm, la eficiencia de absorción para los MWCNTs es prácticamente constante y cercana al 50%. Podemos ahora comparar este valor con otros encontrados en la literatura, como el trabajo de Choudhury et al en el que estudiaban el calentamiento de dispositivos de microfluídica que contenían dispersiones acuosas de CNTs encontrando un valor de 0.5 y otros trabajos en los que se estimaba la eficiencia de calentamiento de SWCNTs mediante experimentos de espectroscopía de absorción en la primera ventana biológica, y en los que Cheng et al encontraban unas eficiencias de absorción que variaban de 0.5 hasta 1. (Cheng et al. 2008, Choudhury et al. 2012)

Esta baja dependencia con la longitud de onda de la eficiencia de absorción fue verificada mediante la adquisición de imágenes térmicas de la dispersión

acuosa de los MWCNTs bajo excitación óptica en las tres longitudes de onda estudiadas. Para ello se introdujo la dispersión acuosa de MWCNTs (con un coeficiente de extinción de $\sim 10 \text{ cm}^{-1}$ en el rango de 800-1100 nm) en una cubeta de cuarzo, de la cual se tomaron imágenes térmicas de su superficie mediante una cámara térmica, cuya técnica se explicó en el **Capítulo 4**. La cubeta fue expuesta a la radiación láser a 808 nm, 980 nm y 1090 nm con una densidad de potencia de 1.4 W/cm^2 y las imágenes se tomaron tras dos minutos de iluminación, cuando se alcanzaba un valor estable de temperatura.

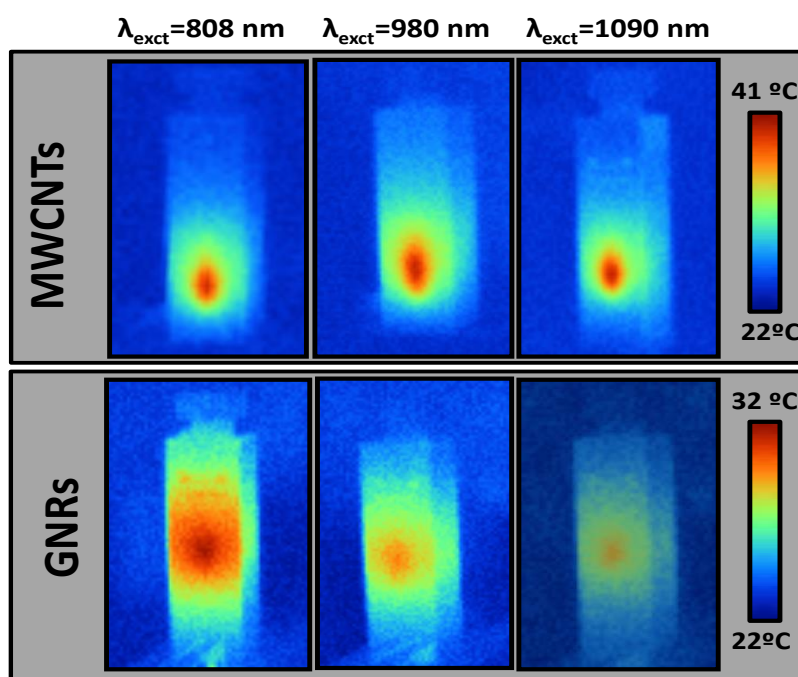


Figura 72. Arriba. Imágenes térmicas de la cubeta contenedora de la dispersión acuosa de MWCNTs (con un coeficiente de extinción de $\sim 10 \text{ cm}^{-1}$ en el rango de 800-1100 nm) bajo excitación láser a 808, 980 y 1090 nm. La densidad de potencia láser era de 1.4 W/cm^2 . Abajo. Imágenes térmicas de la cubeta contenedora de la dispersión acuosa de GNRs (con un coeficiente de extinción de $\sim 2 \text{ cm}^{-1}$ a 808 nm) bajo excitación láser a 808, 980 y 1090 nm. La densidad de potencia láser era de 1.4 W/cm^2 . Todas las imágenes fueron obtenidas bajo las mismas condiciones experimentales y una vez que se alcanzaba el estado estacionario de temperaturas.

Como se puede observar en la **Figura 72** (arriba), la distribución de temperaturas para los tres casos es muy similar, obteniéndose una temperatura máxima de 39, 39.6 y 39.5 °C para la excitación láser de 808, 980 y 1090 nm, respectivamente. Debido a que nuestras medidas de temperatura tenían una

incertidumbre de un 3%, puede considerarse que el calentamiento producido por a las tres longitudes de onda es esencialmente el mismo, lo cual corrobora los resultados previamente obtenidos.

A modo comparativo, también se tomaron imágenes térmicas de una dispersión acuosa de GNRs-s (cuya eficiencia de calentamiento, es de aproximadamente el 100% bajo a excitación a 808 nm, tal como se discutió en la **sección 6.1.2**) bajo excitación óptica a las tres longitudes de onda a estudio. Para ello se introdujo en una cubeta de cuarzo la dispersión acuosa de GNRs-s (con un coeficiente de extinción de 2 cm^{-1} a 808 nm). Las imágenes térmicas pueden verse en la parte inferior de la **Figura 72**. Comparando los resultados de los GNRs-s con los MWCNTs podemos ver que, aunque los MWCNTs muestran una eficiencia de absorción menor que los GNRs-s a 808 nm, la eficiencia de absorción de los MWCNTs no depende críticamente de la longitud de onda de excitación, permitiendo el uso de una amplia gama de longitudes de onda de excitación; sin embargo, para conseguir una alta eficiencia de conversión de la luz en calor con los GNRs-s es necesario utilizar longitudes de onda incluidas en la banda de absorción del plasmón superficial de las nanopartículas. Esto se evidencia en la parte inferior de la **Figura 72**, en la que se puede ver cómo se alcanza un máximo de calentamiento en la cubeta cuándo es excitada por luz láser de 808 nm y va disminuyendo según nos alejamos de este valor, llegando a ser casi despreciable para el caso de 1090 nm. Por lo tanto, podemos concluir que, comparado con MWCNTs, los GNRs-s son unos nanocalentadores más eficientes pero con una dependencia en longitudes de onda mucho mayor, restringiéndose su uso práctico a la región de longitudes de onda dónde se encuentre la resonancia del plasmón superficial, mientras que los MWCNTs tienen la ventaja de poder ser utilizados para realizar terapia fototérmica en las dos ventanas biológicas con una sola solución de estas nanopartículas.

A pesar de haber encontrado que la eficiencia de calentamiento de los MWCNTs es prácticamente independiente de la longitud de onda de excitación, para aplicaciones *in vivo*, los resultados finales de la conversión de la luz en calor no dependen sólo de la eficiencia de calentamiento de las nanopartículas utilizadas, sino que también dependen de la atenuación debida a los tejidos, esto es, de los coeficientes de absorción y scattering de dichos tejidos. Calentar a una longitud de onda en la cual los tejidos absorban de manera apreciable llevará a

una reducción en la potencia láser que llegue a las nanopartículas calentadoras y a un calentamiento no selectivo del tejido aún en ausencia de nanocalentadores. El scattering en los tejidos conllevará una reducción de la potencia láser que alcance las nanopartículas, reduciendo el efecto del tratamiento fototérmico. Por tanto, la longitud de onda óptima para la excitación de las nanopartículas deberá ser tal que minimice tanto la absorción de los tejidos como el esparcimiento de la luz (scattering). Generalmente, como ya se comentó en el **Capítulo 1**, la absorción de los tejidos se minimiza en la I-BW mientras que el scattering disminuye con el aumento de la longitud de onda y, consecuentemente, se minimiza en la II-BW. Para descubrir cuál era la mejor longitud de onda para tratamientos fototérmicos basados en MWCNTs, se realizaron terapias fototérmicas en ratones vivos en ambas ventanas biológicas así como en la región que las separa. Dado que tanto el coeficiente de extinción como la eficiencia de calentamiento de los MWCNTs son básicamente constantes en las ventanas biológicas, puede considerarse que nuestro estudio llevará a determinar la longitud de onda óptima para efectuar una terapia fototérmica desde el punto de vista de su penetración en los tejidos y selectividad de calentamiento.

Para dicho estudio se utilizaron ratones hembra CD1 de 9 semanas de vida afeitados y anestesiados con isoflurano a los que se inyectaron subcutáneamente (a 2mm de profundidad) 20 μ l de una dispersión de MWCNTs en agua a 1.5mg/mL.

La línea superior de la **Figura 73** muestra las imágenes térmicas, una vez alcanzado el estado de calentamiento estacionario, para ratones no inyectados (experimento de control), bajo irradiación láser de 1W/cm² durante un minuto a 808, 982 y 1090 nm. En todos los casos se puede apreciar un aumento de la temperatura local, al que llamaremos “calentamiento no selectivo”, ya que ocurre en ausencia de MWCNTs y que se debe a la absorción de los tejidos, siendo la magnitud del calentamiento fuertemente dependiente de la longitud de onda utilizada (experimentos de control en la **Figura 73**). El máximo calentamiento no selectivo se produce para la irradiación con el láser de 980 nm ($\Delta T \sim 4^\circ\text{C}$ en la temperatura superficial), mientras que el menor calentamiento no selectivo se encuentra para la irradiación con el láser de 808 nm ($\Delta T \sim 0.05^\circ\text{C}$). Debido a que la absorción del agua es de <0.1 , 0.5 y 0.25 cm^{-1} para 808, 980 y 1090 nm respectivamente, y asumiendo que esta absorción es responsable del

calentamiento de los tejidos en ausencia de MWCNTs, el máximo calentamiento sería esperable para 980 nm seguido de 1090 nm y el menor para 808 nm, como vemos experimentalmente.

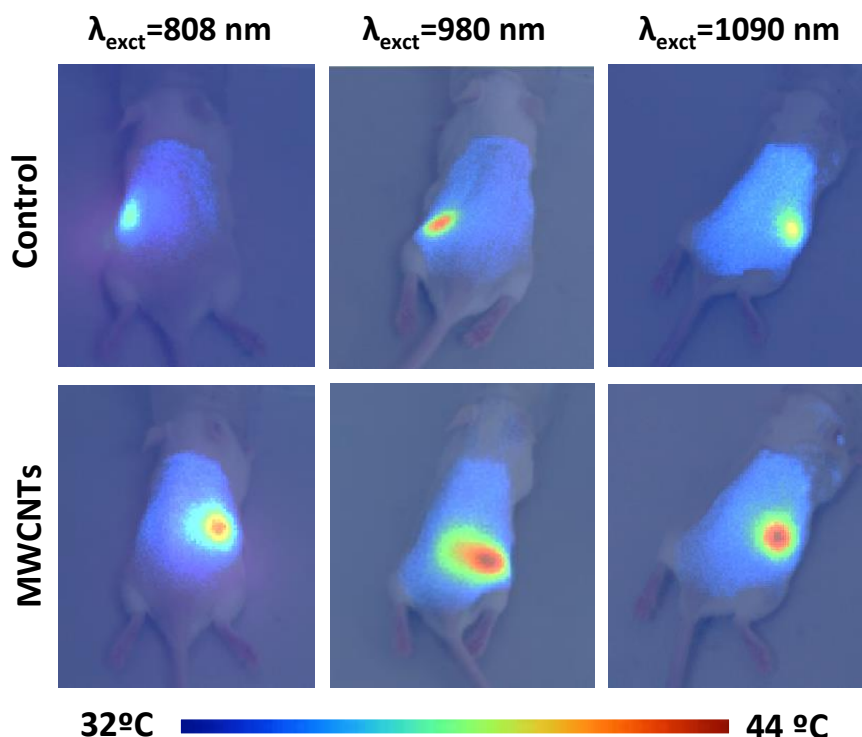


Figura 73. Imágenes térmicas de ratones bajo irradiación láser de $1\text{W}/\text{cm}^2$ a 808, 980 y 1090 nm, obtenidas cuando el estado estacionario de calentamiento era alcanzado (tras un minuto de irradiación). La línea superior corresponde a las imágenes térmicas obtenidas en ausencia de MWCNTs (experimento de control) mientras que la línea inferior corresponde a aquellas obtenidas cuando el láser iluminaba el área de inyección subcutánea de MWCNTs.

La línea inferior de la **Figura 73** muestra las imágenes térmicas (obviamente correspondiente a la distribución de temperatura superficial) de ratones inyectados con MWCNTs, obtenidas cuándo la irradiación láser se incide en la inyección subcutánea y bajo las mismas condiciones de irradiación que en el caso de las imágenes de los ratones no inyectados (imágenes de control). En todos los casos, como se puede observar, el calentamiento producido por la irradiación láser es superior cuando las nanopartículas se encuentran inyectadas sobre cuando no lo están. Como se puede observar en la **Figura 74(a)** (que muestra temperatura superficial de la zona irradiada alcanzada en presencia y ausencia de

MWCNTs), la temperatura superficial máxima (con MWCNTs) es alcanzada para la irradiación con 1090 nm. Para esta longitud de onda, la temperatura local en la superficie llega a los 44°C.

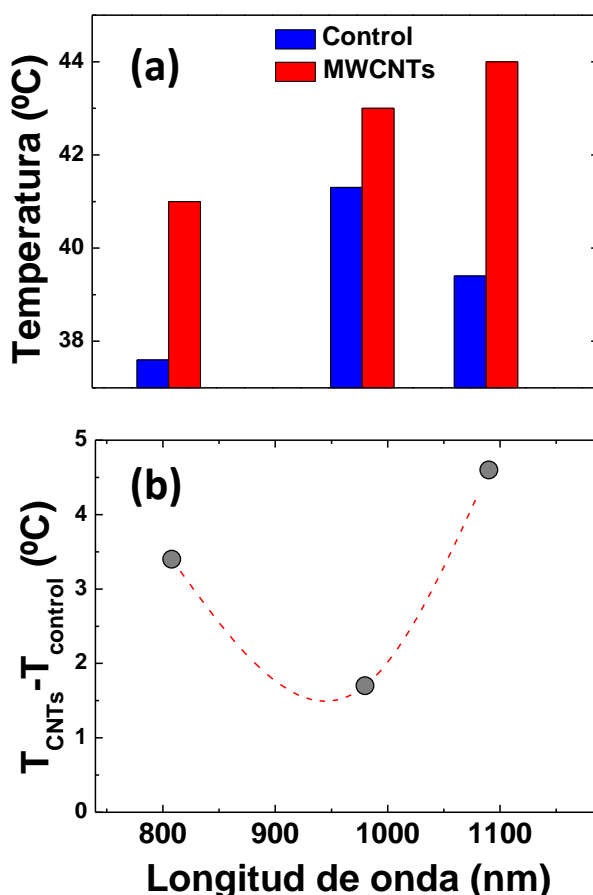


Figura 74 (a) Temperatura máxima de la superficie irradiada del ratón obtenida en ausencia (control) y en presencia de la inyección subcutánea de MWCNTs cuando es irradiada con 808 nm, 980 nm y 1090 nm. La intensidad láser fue en todos los casos de 1 W/cm² y los valores de temperatura corresponden al estado estacionario de calentamiento (un minuto de irradiación). (b) Incremento de temperatura superficial de la zona irradiada inducido por láser causado por las MWCNTs inyectadas respecto del control para las tres irradiaciones utilizadas en este trabajo.

Esta temperatura es claramente mayor que la alcanzada para una irradiación con 808 nm ($\approx 41^\circ\text{C}$) aunque la eficiencia de calentamiento de los MWCNTs es la misma para ambas longitudes de onda (como se aprecia en la Figura 71). Las diferencias entre el calentamiento encontrados *in vivo* para 808

nm y 1090 nm con respecto al encontrado para la misma solución con MWCNTs (ver **Figura 73**) puede explicarse teniendo en cuenta que para 1090 nm el calor no es sólo generado por los MWCNTs, sino también por parte de los tejidos, ya que la absorción de la luz a esta longitud de onda es mayor que para 808 nm, como se puede observar en las imágenes de control (**Figura 73** y **Figura 74 (a)**). Sin embargo, teniendo en cuenta el incremento de temperatura respecto del control, se puede observar que para 1090 nm se producen incrementos de temperaturas más altos que para 808 nm (como se ve en la **Figura 74 (b)**). Por ello se puede decir que, aunque 808 nm es una longitud de onda que se absorbe menos por los tejidos que 1090 nm, la cantidad de radiación láser de 808 nm que llega a la inyección subcutánea de MWCNTs es menor, debido al mayor scattering a esta longitud de onda. Para el caso de irradiación láser a 980 nm, el incremento de temperatura causado por los MWCNTs, respecto del control, es menor que el causado por irradiación a 808 nm y 1090 nm. Este hecho se puede explicar debido a que 980 nm marca el límite de separación entre las dos ventanas biológicas y, consecuentemente, la irradiación láser que llega a la inyección subcutánea de nanopartículas se ve reducida por la combinación de scattering y, sobre todo, por absorción de la luz por el agua de los tejidos.

Los datos incluidos en la **Figura 73** y la **Figura 74**, revelan que, para terapias fototérmicas *in vivo* basadas en MWCNTs, el uso de radiación láser en la I-BW o la II-BW optimiza el tratamiento ya que utilizando radiación láser a 980 nm, esto es, entre ambas ventanas biológicas, la absorción del agua se convierte en la fuente de calentamiento predominante, relegando a segundo plano al calentamiento producido por las nanopartículas y, por consiguiente, llevando a un calentamiento no selectivo de los tejidos irradiados. De los datos anteriormente señalados también se desprende que la irradiación a 1090 nm (II-BW) produce un mayor calentamiento que la irradiación a 808 nm (I-BW). Sin embargo, para alcanzar un calentamiento altamente selectivo será aconsejable utilizar radiación láser de 808 nm ya que sólo se calienta la zona que realmente se quiere irradiar. Proponemos, por tanto, que esta debe ser la longitud de onda óptima para experimentos de terapia fototérmica *in vivo*.

Conclusiones.

En el presente capítulo se han estudiado sistemáticamente las eficiencias de calentamiento de distintas nanopartículas para evaluar su uso práctico en terapias fototérmicas.

Primero se estudió la influencia de la geometría en la eficiencia de calentamiento en nanopartículas de oro; para ello se estudiaron las eficiencias de calentamiento de cinco geometrías distintas de nanopartículas de oro (nano cáscaras de oro, nano bastoncillos de oro, nano dados de oro y dos tipos distintos de nanoestrellas de oro), todas ellas presentando una longitud de onda de resonancia superficial muy próxima, alrededor de 808 nm, encontrándose que la eficiencia se maximiza para las geometrías de nanoestrellas puntiagudas y nano bastoncillos de oro, ambos presentando eficiencias cercanas al 100%. Se propone, no obstante, que los nano bastoncillos de oro sean las utilizadas como nanopartículas calentadoras entre todas las geometrías de nanopartículas de oro estudiadas, ya que se ha demostrado que presentan una muy buena eficiencia de internalización celular.

Una vez propuesto que los nano bastoncillos de oro son las nanopartículas calentadoras adecuadas, se evaluó la eficiencia de calentamiento de estas nanopartículas en las dos ventanas biológicas, debido a la fácil sintonizabilidad de su longitud de onda de resonancia superficial longitudinal durante el proceso de síntesis mediante la elección de las dimensiones específicas de la nanopartícula. Para ello se estudiaron nano bastoncillos de oro con sus longitudes de onda de resonancia alrededor de 808 nm, 900 nm, 980 nm y 1090 nm; observándose una tendencia general de disminución de la eficiencia de calentamiento en la primera ventana biológica, en la que se obtenían unos resultados cercanos al 100% de eficiencia, hasta la segunda en la que esta eficiencia baja hasta aproximadamente el 30%.

Por último se ha evaluado la eficiencia de calentamiento de nanotubos de carbono en las ventanas biológicas, encontrándose que esta eficiencia es prácticamente constante y cercana al 50%; Aprovechando este hecho, se determinó la longitud de onda óptima a utilizar en terapias fototérmicas en aplicaciones *in vivo*, utilizando ratones. A la vista de los resultados experimentales

obtenidos se concluyó que, para alcanzar un calentamiento altamente selectivo será aconsejable utilizar radiación láser de 808 nm.

7 ■ Fototermia controlada.

Introducción

La temperatura juega un papel crucial en la determinación de la dinámica y viabilidad de los sistemas biológicos; ya sea de células u organismos complejos. (Hildebrandt et al. 2002, Wust et al. 2002, Chichef et al. 2007, Roti Roti 2008, Burlaka et al. 2010) En el caso de los humanos, cualquier incremento de temperatura sobre la temperatura corporal normal (cercana a los 37°C) suele estar asociado como un signo de enfermedad y que podría llevar a un daño irreversible e incluso letal para el organismo. (Wunderlich 1871, O'Grady et al. 1998, Mackowiak 2000) Sin embargo, el incremento controlado de la temperatura del organismo también podría llevar a efectos positivos en pacientes con enfermedades, como el cáncer. (Van der Zee 2002, Wust et al. 2002) Los beneficios de la terapia térmica en el tratamiento del cáncer ya fueron reportados durante el siglo XIX. En estos estudios pioneros se administraba una bacteria que producía una infección con la aparición de fiebre en pacientes con cáncer, causando una regresión parcial de los tumores. (Hobohm 2009) Sin embargo, y debido a que tanto los métodos de calentamiento como los métodos para medir la temperatura de la época eran bastante rudimentarios, las tasas de éxito y reproducibilidad eran bastante escasas y no fue ya hasta la década de 1980 cuando el interés sobre este tipo de terapias se volvió a reactivar. (Habash et al. 2006)

Generalmente, la eficacia de los tratamientos de hipertermia se relaciona con la magnitud del incremento de temperatura, consiguiendo diferentes efectos en los tejidos.

Debido a las grandes diferencias entre los resultados obtenidos al aumentar la temperatura en menor o mayor grado, es esencial el control de la temperatura en este tipo de tratamientos. Para ello se han utilizado varios métodos de medida de la temperatura no invasivos como la termometría de ultrasonidos, (Arthur et al. 2005) la impedancia tomográfica (Meaney et al. 1996) y la radiometría por microondas. A pesar de los buenos resultados que estas técnicas han obtenido, su aplicación en el control de la temperatura nivel celular (temperatura intracelular) está limitada por su baja resolución espacial (superior a un micrómetro). Sin embargo, y gracias a la entrada en escena de los nanotermómetros fluorescentes, se puede hacer frente a esta limitación. Como ya se estudió en el **Capítulo 5**, los

QDs pueden ser utilizados como nanotermómetros fluorescentes. De hecho ya han sido utilizados como sondas para monitorización de la temperatura celular durante la inducción de calor externo, como demostró el grupo de Yang y colaboradores (Yang et al. 2011). La elección de los CdSe-QDs como nanotermómetros está fundamentada en sus ventajosas propiedades. Estos QDs presentan una alta intensidad de luminiscencia y una razonable resolución termométrica (ya comentada en el **Capítulo 5**). Gracias a ellos se llegan a resoluciones submicrométricas.

En este capítulo se presenta la utilización de CdSe-QDs como nanotermómetros durante la inducción de un tratamiento fototérmico de células aisladas. La incorporación simultánea de GNRs como nanocalentadores y CdSe-QDs como nanotermómetros posibilita el control de las terapias hipertérmicas a nivel celular.

7.1. Incorporación de las nanopartículas a las células.

Para el propósito de la incorporación simultánea de los nanocalentadores y los nanotermómetros a las células vivas se preparó una solución en PBS de GNRs con el $\lambda_{SPR}=808$ nm de la compañía Nanopartz (cuyas propiedades y dimensiones fueron discutidas en el **Capítulo 4**) y además CdSe-QDs (de tamaño aproximado de 4 nm de la compañía Invitrogen cuyas dimensiones y estructura fueron descritas también en el **Capítulo 4**). El propósito es que, en dicha solución, los GNRs actúen como nanocalentadores excitables en la primera ventana biológica (808 nm) mientras que los QDs actúan como nanotermómetros fluorescentes. Cabe mencionar aquí que aunque los CdSe-QDs aquí seleccionados presentan una absorción en el visible (**Figura 49**), aunque potencialmente pueden también ser excitados en el infrarrojo mediante procesos de excitación multifotónica. Los GNRs escogidos fueron aquellos que presentaban una mayor eficiencia de calentamiento, según se detalló en el **Capítulo 6**. Por su parte, la sensibilidad a la temperatura de los CdSe-QDs se detalló en el **Capítulo 5**.

La concentración de las nanopartículas en la dispersión mixta se eligió de tal manera que la intensidad de la luminiscencia de los CdSe-QDs fuera suficiente para su detección, a la vez que su absorción no perturbase la absorción de los nanocalentadores ($4.8 \cdot 10^{13}$ CdSe-QDs/cm³). A su vez la concentración de GNRs se escogió de manera que el tratamiento fototérmico pudiera ser eficiente ($5 \cdot 10^9$ GNRs/cm³). Los estudios sobre la toxicidad están detallados en el **Capítulo 5**.

La **Figura 75 (a)** muestra una imagen de microscopía electrónica de transmisión de los componentes de la solución mixta en la que se revela la distribución aleatoria de ambos tipos de nanopartículas (GNRs y CdSe-QDs). Es importante tener en cuenta que la presencia de los dos tipos de nanopartículas no lleva a la formación de aglomerados, como se puede ver en la **Figura 75 (b)**, en la que se ve una imagen óptica del vial que contiene la mezcla de nanotermómetros y nanocalentadores. Esta mezcla no presentó signos de aglomeración durante meses. Como se puede ver en esta figura, los CdSe-QDs no presentan una forma totalmente esférica, pese a que nominalmente la casa los presenta de esta manera.

La **Figura 75 (c)** muestra el espectro de extinción de la muestra mixta de CdSe-QDs con GNRs en PBS, el cual está dominado por el espectro de extinción característico de los GNRs, en el que se puede observar el plasmón superficial longitudinal a 808 nm y el transversal a 514 nm, sin embargo, la contribución de la absorción de los CdSe-QDs no se puede apreciar, como vemos si comparamos con la **Figura 49**. Por otra parte, la mayor eficiencia de fluorescencia de los CdSe-QDs frente a los GNRs (éstos sólo emiten bajo excitación multifotónica, láseres pulsados) hace que las propiedades luminiscentes de la solución estén dominados por el espectro de emisión de los CdSe-QDs, como se puede ver en la **Figura 75 (d)**, en la que vemos el espectro de emisión de la solución bajo excitación con un láser de argón a 488 nm.

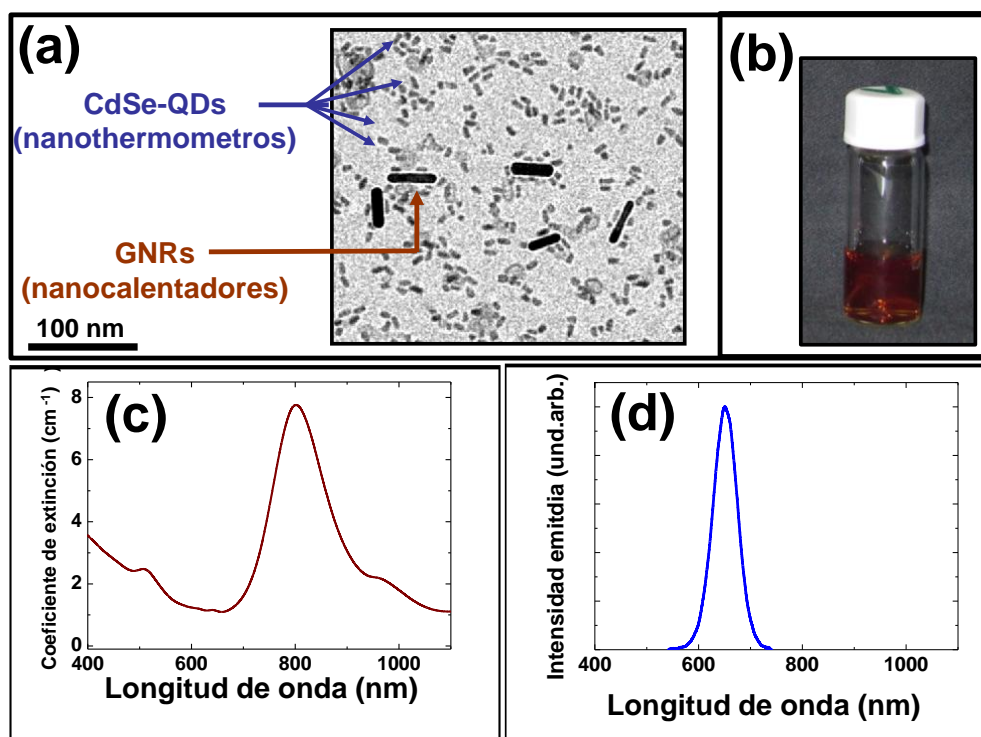


Figura 75. (a) Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la solución mixta de CdSe-QDs (nanotermómetros) y GNRs (nanocalentadores). (b) Fotografía de la solución mixta de CdSe-QDs y GNRs. (c) Espectro de extinción a temperatura ambiente de la solución mixta de CdSe-QDs y GNRs. (d) Espectro de emisión a temperatura ambiente de la solución mixta de CdSe-QDs y GNRs al ser excitada a 488nm.

Para la investigación de la incorporación simultánea de los nanotermómetros y los nanocalentadores en células vivas utilizamos células HeLa.

Las células HeLa son una línea celular inmortalizada derivada de cáncer de cuello de útero con fenotipo epitelial. Este tipo de células tiene la propiedad de poder dividirse indefinidamente *in vitro* si cuentan con los nutrientes y el espacio para deshacerse de los desechos necesarios. Este tipo de línea celular ha sido muy investigada por su gran resistividad a condiciones adversas. (Masters 2002) Además, estas células tienen otro aspecto a resaltar por el cual fueron elegidas para nuestro estudio. Estas células derivan de un tipo de tumor que es completamente accesible a la irradiación externa con láser, lo cual constituye un escenario realista en el cual probar las posibilidades de éxito en una terapia fototérmica controlada.

Las células HeLa utilizadas fueron incubadas durante dos horas a 37°C con la solución de CdSe-QDs y GNRs en PBS. Tras la incubación, la internalización de las nanopartículas en las células fue estudiada por fluorescencia excitada por dos fotones utilizando un microscopio multifotónico ultrarrápido, con un juego de filtros que dejaba detectar la posible fluorescencia proveniente de la muestra centrada en 650 nm (estudiado en el **Capítulo 4**). La **Figura 76** muestra las imágenes ópticas de transmisión (**Figura 76(a)**), la imagen de fluorescencia (**Figura 76(b)**) y la superposición de ambas (**Figura 76(c)**) de un grupo de células HeLa incubadas con la solución de CdSe-QDs y GNRs en PBS. La fluorescencia de las células fue excitada bajo irradiación láser de 480 nm y, como se puede observar en la **Figura 76(b)**, la banda de fluorescencia centrada en 650 nm fue recolectada. Esta banda nos indica que sólo la emisión proveniente de los CdSe-QDs es visible, y por tanto, que las células han incorporado este tipo de nanopartículas.

Para comprobar la incorporación de los GNRs a las células se examinaron las mismas células HeLa incubadas con la solución de CdSe-QDs y GNRs en PBS con un microscopio electrónico de transición (TEM). En la **Figura 76 (d)** se puede ver en detalle la imagen de TEM. En esta imagen se puede apreciar claramente la membrana celular (indicada en la imagen). Debido a la heterogeneidad del espacio intracelular y al pequeño tamaño de los CdSe-QDs éstos no se observan en la imagen; sin embargo, la presencia de GNRs dentro de las células es evidente. La **Figura 76 (d)** muestra la presencia de un GNR dentro de una vesícula. Este hecho confirma la incorporación intracelular de GNRs por el proceso de endocitosis. También es importante señalar, que la densidad de GNRs en el

interior de las vesículas es heterogénea, como se puede constatar en la **Figura 76 (e)**, por lo que la incorporación a las células no tiene por qué ser homogénea.

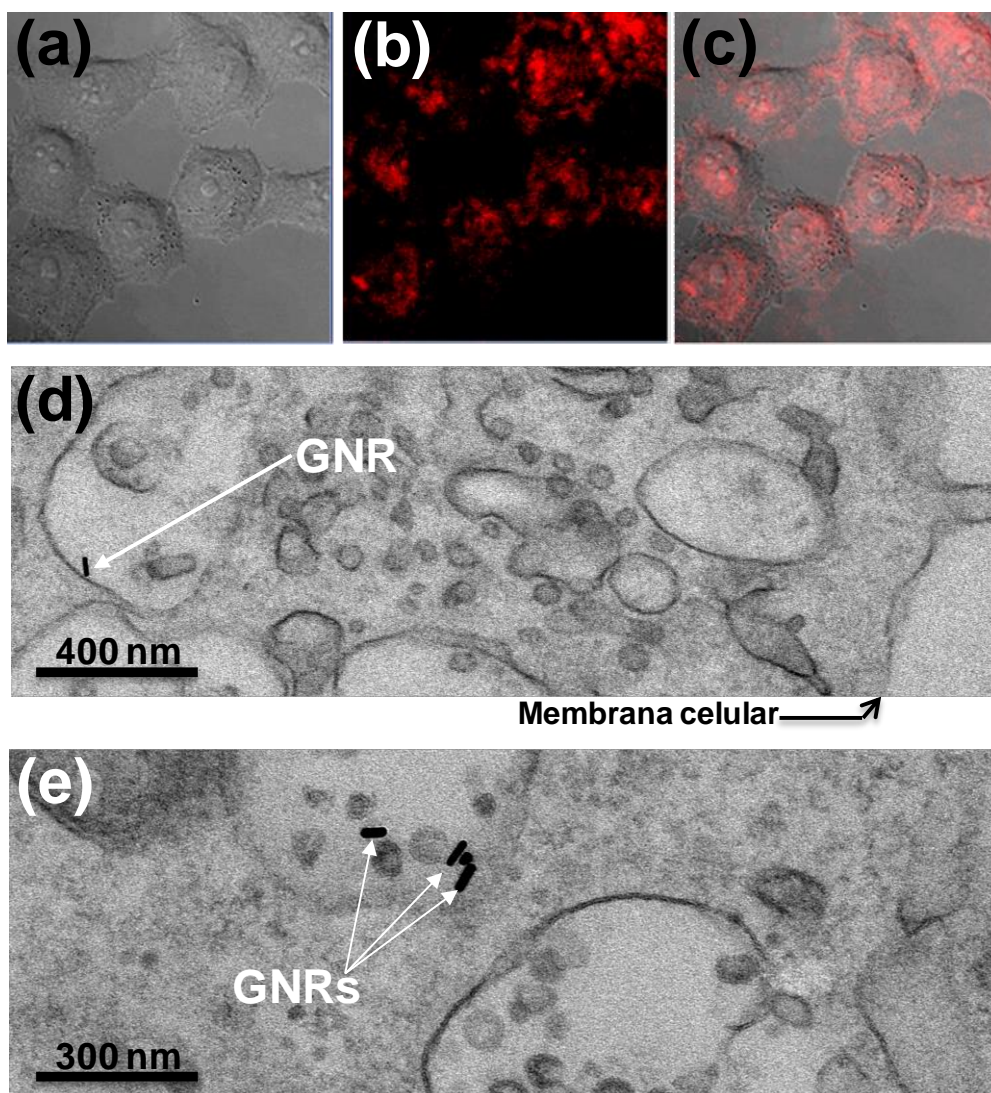


Figura 76. (a) Imagen óptica de transmisión, (b) imagen de fluorescencia y (c) imagen superpuesta de un grupo de células HeLa incubadas a 37°C con la solución mixta de CdSe-QDs-GNRs en PBS. (d) Detalle de la imagen de microscopía electrónica de trasmisión de una célula HeLa incubada a 37°C con la solución mixta de CdSe-QDs-GNRs en PBS. La posición de la membrana celular está indicada. Las flechas blancas revelan la presencia de un GNR dentro de una vesícula. Esta imagen prueba la incorporación intracelular de los GNRs. (e) Imagen de transmisión electrónica de una vesícula intracelular contenedora de varios GNRs.

Tanto las imágenes multifotónicas como las de microscopía de transmisión previamente analizadas nos ayudan a estimar la concentración, a primer orden, del número de CdSe-QDs y GNRs incorporados a las células HeLa. Para ello supusimos que cada pixel de la imagen multifotónica correspondía a un CdSe-QDs, por tanto, el número total de pixeles en la imagen nos da una idea del número mínimo de CdSe-QDs en cada célula, que en nuestro caso es de 5000. Por otra parte, analizando las imágenes de TEM, contando el número de GNRs por área en las células, el número medio de GNRs incorporados en cada célula está cercano a los 200.

7.2. Experimentos de fototermia controlada.

Una vez que hemos comprobado que ambos tipos de nanopartículas se han incorporado a las células HeLa, se procedió a realizar los experimentos de fototermia controlada. Para ello se utilizó el microscopio de doble haz que fue descrito en el **Capítulo 4**. En el plano focal de ambos objetivos de microscopio se colocó el portamuestras que contenía las células HeLa a estudio. Uno de los objetivos (60X, NA=0.65) fue utilizado para focalizar el haz proveniente de un diodo láser sin polarizar, consiguiendo un haz de $0.7\ \mu\text{m}$ en el punto focal. Este haz, sintonizado a 808 nm para coincidir con la longitud de onda a la que se encuentra la frecuencia de resonancia de los GNRs actuaba como haz de calentamiento. El segundo objetivo (100X, 0.8NA) fue utilizado para focalizar un haz de 488 nm, consiguiendo un punto focal de $0.4\ \mu\text{m}$, el cual fue espacialmente superpuesto al haz de calentamiento dentro de una de las células HeLa. La radiación de 488 nm actuaba como excitación óptica de los CdSe-QDs. La emisión de los CdSe-QDs recogida y analizada mediante un espectrofotómetro nos permitía determinar la temperatura intracelular, como ya se explicó en el **Capítulo 5**. A su vez, un microscopio óptico de transmisión nos servía para monitorizar la morfología celular en cada paso del experimento.

Un esquema del experimento se puede ver en la **Figura 77** (arriba a la izquierda) en el que podemos ver una célula HeLa que tiene en su interior un GNRs y un CdSe-QD. El GNRs es excitado mediante radiación infrarroja, haciendo que se caliente, y la luminiscencia de los CdSe-QDs refleja este calentamiento en la posición del pico de emisión.

Tanto la toma de la temperatura como las imágenes ópticas fueron realizadas esperando en todos los casos el mismo periodo de tiempo (dos minutos), lo que nos asegura que todo nuestro sistema está bajo la misma temperatura.

La viabilidad del sistema experimental descrito queda claramente demostrada en la **Figura 77**. En esta figura se puede apreciar la temperatura intracelular obtenida mediante el análisis de la luminiscencia de los CdSe-QDs, en función de la potencia del láser de calentamiento. Como era de esperar, hay una relación lineal entre la potencia del láser de 808 nm y la temperatura intracelular.

Nótese que, para potencias láseres relativamente bajas (7.5mW, correspondiente a una intensidad cercana a $240\text{kW}/\text{cm}^2$) la temperatura se incrementa en 6°C . Este aumento de la temperatura intracelular es capaz de llevar a la célula (inicialmente a 37°C) hasta el rango citotóxico ($42\text{--}45^\circ\text{C}$) (Roti Roti 2008)

Para poder inequívocamente relacionar el calentamiento con la presencia de GNRs, el mismo experimento fue llevado a cabo pero con células HeLa incubadas sólo con CdSe-QDs (experimento de control). El esquema del experimento se puede ver en la **Figura 77** (arriba a la derecha) mientras que los datos están incluidos en la misma figura (abajo).

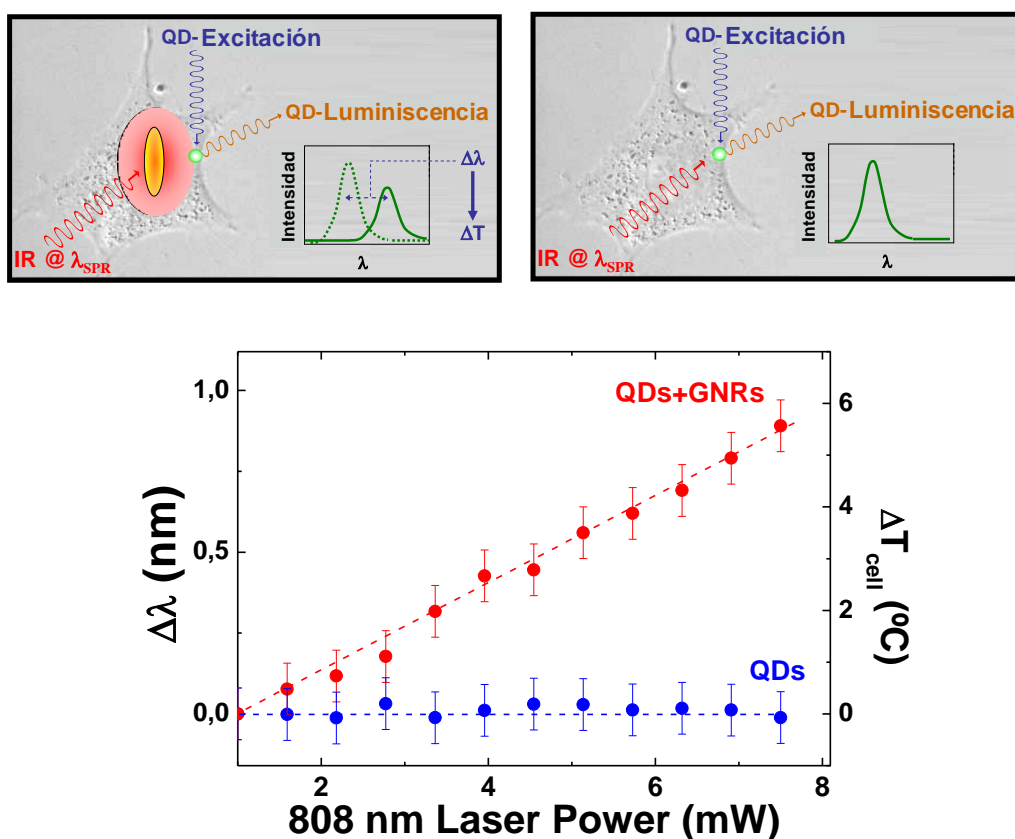


Figura 77. (Arriba izquierda) Representación esquemática del calentamiento intracelular asistido por GNRs y la lectura de la temperatura por los CdSe-QDs. (Arriba derecha) Representación esquemática del mismo efecto pero en ausencia de GNRs. En este caso se espera que no tenga lugar ningún incremento de temperatura. (Abajo) incremento de temperatura intracelular en función de la potencia láser inducida en la célula tanto en presencia como en ausencia de GNRs.

Está bien claro, a la vista de la **Figura 77** que, sin la presencia de nanocalentadores, la radiación láser a 808 nm no causa ningún calentamiento. Por tanto, la única fuente de calor en las células son los GNRs. Es más, se puede concluir que otros mecanismos que podrían aumentar la temperatura (como podrían ser la absorción de la luz por parte de las células) son despreciables, al menos para las potencias láser utilizadas en el experimento y las condiciones de focalización de nuestro trabajo. También es importante señalar que, el aumento de la temperatura también depende de la concentración de GNRs. Utilizar una concentración menor (del orden de 10^8 cm^{-3}) llevaba a un incremento de la temperatura despreciable para las potencias láser a las que podíamos llegar en nuestro sistema experimental. Por otra parte, incubar las células con mayores concentraciones de GNRs (del orden de 10^{10} cm^{-3}) llevaba a la aparición de agregados de GNRs y por tanto, de resultados no reproducibles. Por tanto se puede decir que la concentración de GNRs utilizado en este trabajo (del orden de 10^9 cm^{-3}) puede considerarse la óptima, al menos para las condiciones experimentales utilizadas en nuestro experimento, como ya se comentó en el **Capítulo 6**.

Como se ha mencionado anteriormente, el aumento de temperatura encontrado en el calentamiento intracelular era de 6°C . Esta temperatura podría, en principio, tener efectos en la morfología celular, debido a que se llega a niveles de citotoxicidad celular. Para comprobar estos efectos, realizamos estudios de la morfología celular durante el tratamiento fototérmico. Las imágenes ópticas correspondientes se pueden ver en la **Figura 78**. En esta figura se confirma que con potencias láser relativamente bajas (4mW, correspondiente a una intensidad cercana a $130\text{kW}/\text{cm}^2$), el incremento de temperatura (3°C) produce cambios drásticos en la morfología celular, como se puede ver por la notable aparición de burbujas en la membrana, lo cual es un signo de estrés previo a la muerte celular. Un incremento mayor de calentamiento, con potencias laser de hasta 7.5 mW ($\sim 240\text{kW}/\text{cm}^2$) produce un incremento de temperatura de 6°C , y podemos ver como la muerte celular se aprecia claramente con la desaparición del núcleo y otros orgánulos celulares. Debido al corto periodo de tiempo (dos minutos) al que las células fueron expuestas a la fuente de calentamiento, el mecanismo de muerte celular por el tratamiento de fototermia más probable debe ser el de necrosis celular. La apoptosis es poco probable ya que involucra transcripción de

genes y daño en proteínas, para lo cual se requiere periodos de tiempo más largos. (Vorotnikova et al. 2006)

Es importante señalar que los efectos hipertérmicos observados en nuestros experimentos están unívocamente relacionados con el calor generado por los GNRs, y por tanto, no se aprecian cambios morfológicos en las células que no han sido incubadas con ellos, a pesar de haber estado expuestas a la radiación láser de 808 nm, como también se puede ver en la parte derecha de la **Figura 78** (experimentos de control).

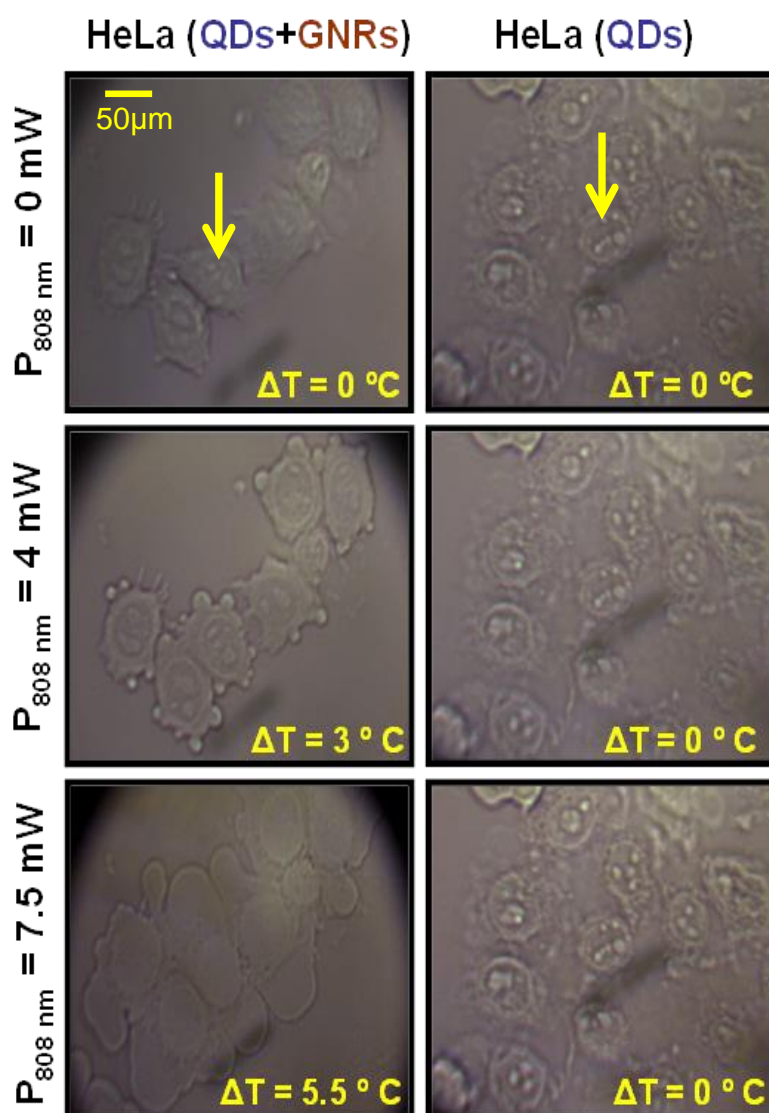


Figura 78. Imágenes ópticas de células HeLa incubadas tanto con la solución de CdSe-QDs y GNRs en PBS (columna de la izquierda) como con sólo CdSe-QDs para diferentes intensidades láser a 808nm. El incremento de temperatura causado (medido mediante la fluorescencia de los CdSe-QDs) en cada caso está indicado.

7.3. Difusión del calor

Por último, y tal como se observa en la **Figura 78**, a pesar de que la radiación de 808 nm estaba enfocada en una sola célula (marcada con una flecha amarilla en la figura), los cambios morfológicos debidos al incremento de la temperatura se extienden a las células colindantes. Este hecho puede atribuirse a efectos de difusión del calor. Es bien sabido que la distribución de temperaturas de un espécimen calentado localmente por un haz láser focalizado depende de varios parámetros, tales como la duración del pulso láser de calentamiento, la tasa de repetición, la intensidad del haz láser, el tamaño de su haz y las condiciones geométricas del espécimen calentado. (Avetisyan et al. 2011, Avetisyan et al. 2012) En nuestro caso, y al estar utilizando un haz láser continuo, la situación es un tanto menos complicada. En su trabajo, Mao et al proponen y verifican un modelo que describe la distribución térmica en microcanales que contienen un líquido que es localmente calentado por un haz láser focalizado. (Mao et al. 2005) En este modelo, ya discutido en la **sección 4.2.3**, y teniendo en cuenta nuestras condiciones experimentales (una profundidad de nuestra cámara de 300 μm y un tamaño del punto focal de 0.7 μm), y utilizando la **ecuación (31)**, podemos ver que el incremento de temperatura está lejos de restringirse al punto focal en la muestra. De hecho, es esperable que el cambio en la temperatura se extienda varias micras (llegando incluso a las decenas) alrededor del punto focal del láser. Este hecho está en acuerdo con el trabajo de Donner et al, en el cual se describía un calentamiento celular producido por un haz láser focalizado en 50 μm de la célula a estudio. (Donner et al. 2012) Como consecuencia, aunque estamos focalizando nuestro haz láser en una célula específica, el calentamiento se expande varias decenas de micras alrededor de esta célula. Además, la difusión de la temperatura ha sido estudiada experimentalmente en esta tesis mediante medidas adicionales, como se puede ver en la **Figura 79**. En esta figura podemos ver la distribución espacial de la temperatura de una solución acuosa de CdSe-QDs con GNRs en PBS en un microcanal de 400 μm de espesor cuando es excitado por un haz láser de 808 nm focalizado (tamaño del punto focal de 0.7 μm); es decir, en condiciones similares a las que realizamos los experimentos con células vivas. Para la adquisición de la imagen térmica, nuestro sistema experimental de doble haz (descrito en el **Capítulo 4**) fue modificado para que un haz láser de 488 nm

pudiera moverse de tal manera que excitara la luminiscencia en cada punto de la imagen bidimensional que podemos ver en la **Figura 79**.

Como podemos ver, el calentamiento inducido por láser se extiende decenas de micras en los alrededores del punto focal del haz de 808 nm. Estos datos experimentales verifican que en nuestro tratamiento fototérmico y debido a la difusión térmica del medio, el calentamiento debido al haz láser no sólo se produzca en la célula en la que está focalizado éste, sino que se extienda a las células adyacentes. Si comparamos la distribución espacial de la temperatura con el campo celular estudiado, podemos ver como los efectos de la temperatura se extienden a todas las células de nuestro campo (seis).

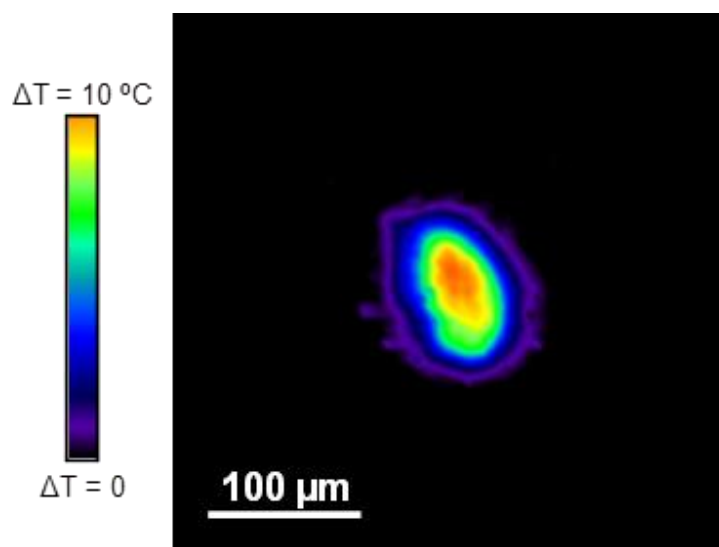


Figura 79. Distribución espacial de temperaturas medida en una solución de CdSe-QDs y GNRs en PBS en un microcanal de $400\mu\text{m}$ de espesor cuando es excitado con un haz láser focalizado de 808 nm en condiciones experimentales similares a las utilizadas en los experimentos con células vivas. La potencia láser a 808 nm era de 10mW ($320\text{kW}/\text{cm}^2$).

Debido a que en nuestro experimento con células vivas el haz láser de lectura de la temperatura (488 nm) se encontraba sobre el haz láser de calentamiento (808 nm), el incremento de temperatura reportado en la **Figura 77** corresponde a la temperatura máxima alcanzada (temperatura en el foco).

Conclusiones

En resumen, en este capítulo se muestra la evidencia experimental del uso de CdSe-QDs como nanotermómetros fluorescentes para lectura en tiempo real de la temperatura intracelular durante el calentamiento de células en cultivo asistido por la excitación del plasmón superficial de nanocalentadores de oro, mediante radiación láser infrarroja.

Una lectura precisa de la temperatura nos permite la posibilidad de elegir los parámetros potencia del láser de calentamiento, evitando la creación de daño térmico irreversible en las células sanas colindantes a las tratadas, lo cual es de vital importancia en tratamientos clínicos.

Los resultados aquí obtenidos suponen un indudable avance hacia el control de terapias hipertérmicas a nivel celular esenciales en el tratamiento temprano, no sólo del cáncer, sino de otras patologías que presentan proliferación celular como la retinopatía diabética o rechazo de órganos transplantados.

Otra ventaja de las nanopartículas aquí utilizadas, tanto como de los nanocalentadores como de los nanotermómetros, es que pueden excitarse en las ventajas biológicas, con lo cual son apropiadas para estudios *in vivo*, con grandes perspectivas de llegar a estudios clínicos.

8. Conclusiones/ Conclusions

8.1. Conclusiones

En este capítulo se resumen los resultados principales obtenidos en esta tesis:

En cuanto al estudio de puntos cuánticos de semiconductor como nanotermómetros luminiscentes:

- (1) Se ha encontrado un tamaño óptimo para aplicaciones de bioimagen para CdTe-QDs correspondiente a un diámetro de 3.8 nm y una emisión de 660 nm, explicándose, además, la existencia de dicho tamaño óptimo.
- (2) Se ha encontrado que algunas de las propiedades luminiscentes de CdSe-QDs sufren cambios con la temperatura de manera que estas nanopartículas pueden ser utilizadas como nanotermómetros luminiscentes. Se ha concluido que el análisis espectral de la banda de luminiscencia y la determinación de la posición espectral del máximo de emisión permite la determinación de la temperatura local del QD de forma precisa ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) e independiente de la concentración local de QDs.
- (3) Se ha comparado la sensibilidad térmica espectral de QDs tanto de CdSe como de CdTe encontrándose que los CdTe-QDs muestran una térmica sensibilidad superior que los CdSe-QDs. Sin embargo, debido a su mayor estabilidad en dispersión acuosa, los CdSe-QDs son, por el momento, una mejor opción para aplicaciones biológicas.
- (4) La sensibilidad térmica de los CdSe-QDs permite la determinación experimental de gradientes térmicos en fluidos así como de la temperatura intracelular durante procesos de hipertermia.
- (5) Los CdTe-QDs de diámetro grande (7.3 nm) permiten conseguir bioimágenes bidimensionales de alta profundidad de penetración en tejidos ya que su luminiscencia se ubica en la ventana biológica.

En cuanto al estudio de distintos tipos de nanopartículas como fotonanocalentadores:

- (6) Tras la realización de un estudio sistemático de la eficiencia de calentamiento de nanopartículas de oro con diferentes geometrías se concluyó que su eficiencia de calentamiento se maximiza para las geometrías de nanoestrellas puntiagudas y nano bastoncillos de oro, ambos presentado eficiencias cercanas al 100%.
- (7) Se evaluó la eficiencia de calentamiento de nano bastoncillos de oro. SE concluyó que la eficiencia de calentamiento de los nano bastoncillos de oro era fuertemente dependiente de su tamaño y, por lo tanto, de la posición espectral de su resonancia plasmónica. Se observó una tendencia general de disminución de la eficiencia de calentamiento al desplazar la resonancia plasmónica desde la primera a la segunda ventana biológica.
- (8) Se ha evaluado la eficiencia de calentamiento de nanotubos de carbono bajo excitación óptica en las dos ventanas biológicas, encontrándose que esta eficiencia es prácticamente constante y cercana al 50%.
- (9) Se analizó la selectividad y eficiencia de tratamientos fototérmicos basados en nanotubos de carbono en aplicaciones *in vivo*. Se concluyó que la eficiencia y selectividad del tratamiento se optimizaba bajo excitación a 800 nm.

Los resultados aquí obtenidos avanza hacia el control de terapias hipertérmicas a nivel celular esenciales en el tratamiento temprano, no sólo del cáncer, sino de otras patologías que presentan proliferación celular como la retinopatía diabética o rechazo e órganos trasplantados.

Otra ventaja de las nanopartículas aquí presentadas tanto como nanocalentadores como nanotermómetros es que pueden excitarse en las dos ventanas biológicas, con lo cual son apropiadas para estudios con perspectivas de llegar a estudios clínicos que involucran el uso de modelos animales.

1.1. Conclusions

In this chapter the main results of this thesis are summarized:

The main results concerning semiconductor quantum dots as luminescent nanothermometers:

(1) An optimum CdTe-QDs size has been found in bioimaging applications corresponding to a 3.8 nm diameter whose emission lies at 660 nm and the reason why this optimum size exists has been explained.

(2) It has been found that some luminescent properties of CdSe-QDs suffer temperature related changes so these nanoparticles can be used as fluorescence nanothermometers. It has been concluded that the luminescent spectral band analysis and the determination of its emission maximum spectral position allows the QD local temperature determination in a precise ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) and independently of the QDs concentration way.

(3) The spectral thermal sensitivity of CdSe-QDs and CdTe-QDs have been compared. It has been found that CdTe-QDs present a greater thermal sensitivity. Nevertheless, due to their better colloidal stability in water, CdSe-QDs are a better option by now in order to use them in biological applications.

(4) The thermal sensibility of CdSe-QDs allows the experimental determination of thermal gradients in fluids and also the intracellular temperature during external heating.

(5) CdTe-QDs of big diameter (7.3 nm) allow us to obtain in depth bidimensional bioimages in phantom animal tissues by multiphoton excitation.

The main results concerning the study of different nanoparticles as nanoheaters are:

(6) The heating efficiency of different gold geometries has been systematically investigated. It has been found that the heating efficiency is maximized for two different geometries, long arm nanostars and gold nanorods, whose heating efficiency is close to 100%. However, gold nanorods are proposed as nanoheaters due to its highly efficient cellular internalization.

(7) The heating efficiency of gold nanorods under excitation within both biological windows has been evaluated. A general tendency has been found in which the heating efficiency decreases from the one found in the first biological window (close to 100%) to that found in the second biological window (close to 30%).

(8) The heating efficiency of carbon nanotubes has been evaluated in both biological windows. It has been found that this efficiency is basically constant and close to 50%.

(9) The selectivity and efficiency of carbon nanotubes photothermal treatments in in vivo applications has been evaluated. It is reasonable to suggest, after the results obtained here using carbon nanotubes, to irradiate with 808 nm in order to obtain a highly effective heating.

The results obtained here move up towards hyperthermal controlled therapies at cellular level which is essential in the early treatment, not just in cancer therapies, but in other pathologies which present cellular proliferation such as diabetic retinopathy or organ transplant rejection.

The nanoparticles presented here have another advantage as nanothermometers and nanoheaters, which is that they can be excited within the biological windows, so they are quite appropriate to be a part of clinical studies with animal models.

Referencias

Ahmed, M. and S. Goldberg (2004). "Combination radiofrequency thermal ablation and adjuvant IV liposomal doxorubicin increases tissue coagulation and intratumoural drug accumulation." International journal of hyperthermia **20**(7): 781-802.

Albota, M. A., C. Xu and W. W. Webb (1998). "Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm." Applied Optics **37**(31): 7352-7356.

Alivisatos, A. P., W. Gu and C. Larabell (2005). "QUANTUM DOTS AS CELLULAR PROBES." Annual Review of Biomedical Engineering **7**(1): 55-76.

Antonii, F. (1618). "Panacea Aurea-Auro Potabile." Hamburg: Ex Bibliopolio Frobeniano: 250.

Arthur, R. M., W. L. Straube, J. W. Trobaugh and E. G. Moros (2005). "Non-invasive estimation of hyperthermia temperatures with ultrasound." International Journal of Hyperthermia **21**(6): 589-600.

Arya, H., Z. Kaul, R. Wadhwa, K. Taira, T. Hirano and S. C. Kaul (2005). "Quantum dots in bio-imaging: Revolution by the small." Biochemical and Biophysical Research Communications **329**(4): 1173-1177.

Ashkin, A., J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm and S. Chu (1986). "Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles." Optics Letters **11**(5): 288-290.

Avetisyan, Y. A., A. N. Yakunin and V. V. Tuchin (2011). "Novel thermal effect at nanoshell heating by pulsed laser irradiation: hoop-shaped hot zone formation." Journal of Biophotonics: n/a-n/a.

Avetisyan, Y. A., A. N. Yakunin and V. V. Tuchin (2012). "Thermal energy transfer by plasmon-resonant composite nanoparticles at pulse laser irradiation." Appl. Opt. **51**(10): C88-C94.

Benayas-Hernández, A. (2012). Estudio del sistema RE3+:YAG por medio de Imagen de Fluorescencia: Dispositivos micro-estructurados y Carga Térmica. Doctor, Universidad Autónoma de Madrid.

Bera, D., L. Qian, T.-K. Tseng and P. H. Holloway (2010). "Quantum Dots and Their Multimodal Applications: A Review." Materials **3**(4): 2260-2345.

Bohren, C. F. and D. R. Huffman (2008). Absorption and scattering of light by small particles, John Wiley & Sons.

Boyde, A. (1991). "Colloidal Gold. Principles, Methods and Application." Journal of anatomy **176**: 215.

Brites, C., P. Lima, N. Silva, A. Millán, V. Amaral, F. Palacio and L. Carlos (2013). "Thermometry at the nanoscale using lanthanide-containing organic–inorganic hybrid materials." Journal of Luminescence **133**: 230-232.

Bruce T. Draine, P. J. F. (2012). "User Guide for the Discrete Dipole Approximation Code DDSCAT 7.2." arXiv:1202.3424v2.

Burlaka, A., S. Lukin, S. Prylutska, O. Remeniak, Y. Prylutsky, M. Shuba, S. Maksimenko, U. Ritter and P. Scharff (2010). "Hyperthermic effect of multi-walled carbon nanotubes stimulated with near infrared irradiation for anticancer therapy: in vitro studies." Experimental oncology **32**(1): 48-50.

Cai, W. B., D. W. Shin, K. Chen, O. Gheysens, Q. Z. Cao, S. X. Wang, S. S. Gambhir and X. Y. Chen (2006). "Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects." Nano Letters **6**(4): 669-676.

Carbó-Argibay, E., B. Rodríguez-González, J. Pacifico, I. Pastoriza-Santos, J. Pérez-Juste and L. M. Liz-Marzán (2007). "Chemical Sharpening of Gold Nanorods: The Rod-to-Octahedron Transition." Angewandte Chemie International Edition **46**(47): 8983-8987.

Chan, W. C. and S. Nie (1998). "Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection." Science **281**(5385): 2016-2018.

Chan, W. C. W. and S. M. Nie (1998). "Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection." Science **281**(5385): 2016-2018.

Chapman, C. F., Y. Liu, G. J. Sonek and B. J. Tromberg (1995). "The use of exogenous fluorescent probes for temperature measurements in single living cells." Photochem Photobiol **62**(3): 416-425.

Chen, J., B. Wiley, Z. Y. Li, D. Campbell and F. Saeki (2005). "Gold Nanocages: Engineering Their Structure for Biomedical Applications." Advanced materials (Weinheim) **17**(18): 2255-2261.

Cheng, Q., S. Debnath, E. Gregan and H. J. Byrne (2008). "Effect of Solvent Solubility Parameters on the Dispersion of Single-Walled Carbon Nanotubes." The Journal of Physical Chemistry C **112**(51): 20154-20158.

Chicheł, A., J. Skowronek, M. Kubaszewska and M. Kanikowski (2007). "Hyperthermia – description of a method and a review of clinical applications." Reports of Practical Oncology & Radiotherapy **12**(5): 267-275.

Childs, P., J. Greenwood and C. Long (2000). "Review of temperature measurement." Review of scientific instruments **71**(8): 2959-2978.

Cho, E. C., C. Kim, F. Zhou, C. M. Cobley, K. H. Song, J. Chen, Z.-Y. Li, L. V. Wang and Y. Xia (2009). "Measuring the Optical Absorption Cross Sections of Au–Ag Nanocages and Au Nanorods by Photoacoustic Imaging." The Journal of Physical Chemistry C **113**(21): 9023-9028.

Choudhury, D., D. Jaque, A. Rodenas, W. T. Ramsay, L. Paterson and A. K. Kar (2012). "Quantum dot enabled thermal imaging of optofluidic devices." Lab on a Chip **12**(13): 2414-2420.

Daniel, M. C. and D. Astruc (2004). "Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology." Chemical Reviews **104**(1): 293-346.

Dantas, N. O., P. M. N. de Paula, R. S. Silva, V. Lopez-Richard and G. E. Marques (2011). "Radiative versus nonradiative optical processes in PbS nanocrystals." Journal of Applied Physics **109**(2).

Dantas, N. O., F. Qu, R. S. Silva and P. C. Morais (2002). "Anti-Stokes Photoluminescence in Nanocrystal Quantum Dots." The Journal of Physical Chemistry B **106**(30): 7453-7457.

de Mello Donegá, C., M. Bode and A. Meijerink (2006). "Size- and temperature-dependence of exciton lifetimes in CdSe quantum dots." Physical Review B **74**(8): 085320.

Derfus, A. M., W. C. W. Chan and S. N. Bhatia (2004). "Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots." Nano Letters **4**(1): 11-18.

Di Ninni, P., F. Martelli and G. Zaccanti (2010). "The use of India ink in tissue-simulating phantoms." Optics Express **18**(26): 26854-26865.

Dickerson, B. D. (2005). ORGANOMETALLIC SYNTHESIS KINETICS OF CdSe QUANTUM DOTS. DOCTOR OF PHILOSOPHY, Virginia Polytechnic Institute and State University.

Donner, J. S., S. A. Thompson, M. P. Kreuzer, G. Baffou and R. Quidant (2012). "Mapping Intracellular Temperature Using Green Fluorescent Protein." Nano Letters **12**(4): 2107-2111.

Dresselhaus, G. (1956). "Effective mass approximation for excitons." Journal of Physics and Chemistry of Solids **1**(1-2): 14-22.

Dresselhaus, M. S. and G. Dresselhaus (1962). "Interband Transitions for Metals in a Magnetic Field." Physical Review **125**(2): 499-508.

Dynich, R. and A. Ponyavina (2008). "Effect of metallic nanoparticle sizes on the local field near their surface." Journal of Applied Spectroscopy **75**(6): 832-838.

Ebenstein, Y., T. Mokari and U. Banin (2002). "Fluorescence quantum yield of CdSe/ZnS nanocrystals investigated by correlated atomic-force and single-particle fluorescence microscopy." Applied Physics Letters **80**(21): 4033-4035.

Efros, A. L., M. Rosen, M. Kuno, M. Nirmal, D. J. Norris and M. Bawendi (1996). "Band-edge exciton in quantum dots of semiconductors with a degenerate valence band: Dark and bright exciton states." Physical Review B **54**(7): 4843-4856.

El-Sayed, M. A. (2001). "Some Interesting Properties of Metals Confined in Time and Nanometer Space of Different Shapes." Accounts of Chemical Research **34**(4): 257-264.

Fisher, B. R., H. J. Eisler, N. E. Stott and M. G. Bawendi (2004). "Emission intensity dependence and single-exponential behavior in single colloidal quantum dot fluorescence lifetimes." Journal of Physical Chemistry B **108**(1): 143-148.

Flock, S. T., S. L. Jacques, B. C. Wilson, W. M. Star and M. J. van Gemert (1992). "Optical properties of Intralipid: a phantom medium for light propagation studies." Lasers Surg Med **12**(5): 510-519.

Fox, A. M. (2001). Optical properties of solids. Oxford, Oxford university press.

Franceschetti, A. and A. Zunger (1997). "Direct Pseudopotential Calculation of Exciton Coulomb and Exchange Energies in Semiconductor Quantum Dots." Physical Review Letters **78**(5): 915-918.

Frangioni, J. V. (2003). "In vivo near-infrared fluorescence imaging." Current Opinion in Chemical Biology **7**(5): 626-634.

Garcia, M. A. (2011). "Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications." Journal of Physics D: Applied Physics **44**(28): 283001.

Ghosh, S., S. Dutta, E. Gomes, D. Carroll, R. D'Agostino, Jr., J. Olson, M. Guthold and W. H. Gmeiner (2009). "Increased Heating Efficiency and Selective Thermal Ablation of Malignant Tissue with DNA-Encased Multiwalled Carbon Nanotubes." Acs Nano **3**(9): 2667-2673.

Giljohann, D. A., D. S. Seferos, W. L. Daniel, M. D. Massich, P. C. Patel and C. A. Mirkin (2010). "Gold Nanoparticles for Biology and Medicine." Angewandte Chemie International Edition **49**(19): 3280-3294.

Grabolle, M., M. Spieles, V. Lesnyak, N. Gaponik, A. Eychmuller and U. Resch-Genger (2009). "Determination of the Fluorescence Quantum Yield of Quantum Dots: Suitable Procedures and Achievable Uncertainties." Analytical Chemistry **81**(15): 6285-6294.

Habash, R. W., R. Bansal, D. Krewski and H. T. Alhafid (2006). "Thermal therapy, part 1: an introduction to thermal therapy." Crit Rev Biomed Eng **34**(6): 459-489.

Hama, Y., Y. Koyama, Y. Urano, P. L. Choyke and H. Kobayashi (2007). "Simultaneous two-color spectral fluorescence lymphangiography with near infrared quantum dots to map two lymphatic flows from the breast and the upper extremity." Breast Cancer Research and Treatment **103**(1): 23-28.

Hauser, E. A. (1952). "Aurum potabile." Journal of Chemical Education **29**(9): 456.

Hessel, C. M., V. P. Pattani, M. Rasch, M. G. Panthani, B. Koo, J. W. Tunnell and B. A. Korgel (2011). "Copper Selenide Nanocrystals for Photothermal Therapy." Nano Letters **11**(6): 2560-2566.

Hildebrandt, B., P. Wust, O. Ahlers, A. Dieing, G. Sreenivasa, T. Kerner, R. Felix and H. Riess (2002). "The cellular and molecular basis of hyperthermia." Crit Rev Oncol Hematol **43**(1): 33-56.

Hironobu, T., N. Takuro, N. Ayuko, N. Yasuro and Y. Sunao (2006). "Photothermal reshaping of gold nanorods prevents further cell death." Nanotechnology **17**(17): 4431.

Hobohm, H.-U. (2009). Healing Heat: An Essay on Cancer Immune Defence, BoD-Books on Demand.

Hu, M., J. Chen, Z.-Y. Li, L. Au, G. V. Hartland, X. Li, M. Marquez and Y. Xia (2006). "Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications." Chemical Society Reviews **35**(11): 1084-1094.

Huang, X., I. H. El-Sayed, W. Qian and M. A. El-Sayed (2006). "Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods." J Am Chem Soc **128**(6): 2115-2120.

Imbusch, G. F. (1989). Optical Spectroscopy of Inorganic Solids. New York, Oxford Science.

Jacinto, C., D. N. Messias, A. A. Andrade, S. M. Lima, M. L. Baesso and T. Catunda (2006). "Thermal lens and Z-scan measurements: Thermal and optical properties of laser glasses - A review." Journal of Non-Crystalline Solids **352**(32-35): 3582-3597.

Jain, P. K., I. H. El-Sayed and M. A. El-Sayed (2007). "Au nanoparticles target cancer." Nano Today **2**(1): 18-29.

Jain, P. K., K. S. Lee, I. H. El-Sayed and M. A. El-Sayed (2006). "Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine." J Phys Chem B **110**(14): 7238-7248.

Jana, N. R., C. Earhart and J. Y. Ying (2007). "Synthesis of water-soluble and functionalized nanoparticles by silica coating." Chemistry of Materials **19**(21): 5074-5082.

Jaque, D., L. Martínez Maestro, B. Del Rosal, P. Haro-Gonzalez, A. Benayas, J. L. Plaza, E. Martín Rodríguez and J. García Solé (2014). "Nanoparticles for photothermal therapies." Nanoscale **6**(16): 9494-9530.

Jaque, D. and F. Vetrone (2012). "Luminescence nanothermometry." Nanoscale **4**(15): 4301-4326.

Jaque Garcia, D., L. Martinez Maestro, B. del Rosal, P. Haro, A. Benayas, J. L. Plaza, E. Martin Rodriguez and J. G. Sole (2014). "Nanoparticles for photothermal therapies." Nanoscale.

Jeongkyu, Y., W. Nayoun, K. Sungjee and C. Jee Hyun (2008). Near-Infrared Quantum Dots Imaging in the Mouse Brain, Optical Society of America.

Ji, S. R., C. Liu, B. Zhang, F. Yang, J. Xu, J. A. Long, C. Jin, D. L. Fu, Q. X. Ni and X. J. Yu (2010). "Carbon nanotubes in cancer diagnosis and therapy." Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer **1806**(1): 29-35.

Jiang, W., A. Singhal, B. Y. S. Kim, J. Zheng, J. T. Rutka, C. Wang and W. C. W. Chan (2008). "Assessing Near-Infrared Quantum Dots for Deep Tissue, Organ, and Animal Imaging Applications." Journal of the Association for Laboratory Automation **13**(1): 6-12.

Jing, P., J. Zheng, M. Ikezawa, X. Liu, S. Lv, X. Kong, J. Zhao and Y. Masumoto (2009). "Temperature-Dependent Photoluminescence of CdSe-Core CdS/CdZnS/ZnS-Multishell Quantum Dots." The Journal of Physical Chemistry C **113**(31): 13545-13550.

Kahn, R. (1928). "Serum Diagnosis for Syphilis." Colloid Chemistry **2**: 757.

Kerker, M. (1969). CHAPTER 3 - Scattering by a Sphere. The Scattering of Light and Other Electromagnetic Radiation. M. Kerker, Academic Press. **16**: 27-96.

Kershaw, S. V., M. Burt, M. Harrison, A. Rogach, H. Weller and A. Eychmuller (1999). "Colloidal CdTe/HgTe quantum dots with high photoluminescence quantum efficiency at room temperature." Applied Physics Letters **75**(12): 1694-1696.

Klostranec, J. M. and W. C. W. Chan (2006). "Quantum Dots in Biological and Biomedical Research: Recent Progress and Present Challenges." Advanced Materials **18**(15): 1953-1964.

Kobayashi, M., Y. Ito, N. Sakauchi, I. Oda, I. Konishi and Y. Tsunazawa (2001). "Analysis of nonlinear relation for skin hemoglobin imaging." Opt Express **9**(13): 802-812.

Koch, H. H. a. S. W. Quantum Dots. Quantum Theory of the Optical and Electronic Properties of Semiconductors: 383-400.

Konig, K. (2000). "Multiphoton microscopy in life sciences." J Microsc **200**(Pt 2): 83-104.

Kreibig, U., B. Schmitz and H. D. Breuer (1987). "Separation of plasmon-polariton modes of small metal particles." Physical Review B **36**(9): 5027-5030.

Kunckels, J. (1676). "Nuetliche Observationes oder Anmerkungen von Auro und Argento Potabili." Schutzens, Hamburg.

Kuo, W. S., C. N. Chang, Y. T. Chang, M. H. Yang, Y. H. Chien, S. J. Chen and C. S. Yeh (2010). "Gold nanorods in photodynamic therapy, as hyperthermia agents, and in near-infrared optical imaging." Angew Chem Int Ed Engl **49**(15): 2711-2715.

Kuruganti, P. T. and H. Qi (2002). Asymmetry analysis in breast cancer detection using thermal infrared images. Engineering in Medicine and Biology, 2002. 24th Annual Conference and the Annual Fall Meeting of the Biomedical Engineering Society EMBS/BMES Conference, 2002. Proceedings of the Second Joint, IEEE.

Leistikow, M. D., J. Johansen, A. J. Kettelarij, P. Lodahl and W. L. Vos (2009). "Size-dependent oscillator strength and quantum efficiency of CdSe quantum dots controlled via the local density of states." Physical Review B **79**(4).

Levi-Polyachenko, N. H., E. J. Merkel, B. T. Jones, D. L. Carroll and J. H. Stewart (2009). "Rapid Photothermal Intracellular Drug Delivery Using Multiwalled Carbon Nanotubes." Molecular Pharmaceutics **6**(4): 1092-1099.

Link, S. and M. A. El-Sayed (2000). "Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals." International Reviews in Physical Chemistry **19**(3): 409-453.

Mackowiak, P. A. (2000). "Temperature regulation and the pathogenesis of fever." Principles and practice of infectious diseases **6**: 703-718.

Madsen, S. J., M. S. Patterson and B. C. Wilson (1992). "THE USE OF INDIA INK AS AN OPTICAL ABSORBER IN TISSUE-SIMULATING PHANTOMS." Physics in Medicine and Biology **37**(4): 985-993.

Maestro, L. M., P. Haro-Gonzalez, J. G. Coello and D. Jaque (2012). "Absorption efficiency of gold nanorods determined by quantum dot fluorescence thermometry." Applied Physics Letters **100**(20): 201110.

Maestro, L. M., E. M. Rodriguez, F. Vetrone, R. Naccache, H. L. Ramirez, D. Jaque, J. A. Capobianco and J. G. Sole (2010). "Nanoparticles for highly efficient multiphoton fluorescence bioimaging." Opt Express **18**(23): 23544-23553.

Mao, H. B., J. R. Arias-Gonzalez, S. B. Smith, I. Tinoco and C. Bustamante (2005). "Temperature control methods in a laser tweezers system." Biophysical Journal **89**(2): 1308-1316.

Marple, D. T. F. (1963). "Effective Electron Mass in CdTe." Physical Review **129**(6): 2466-2470.

Marquez, G., L. V. Wang, S. P. Lin, J. A. Schwartz and S. L. Thomsen (1998). "Anisotropy in the absorption and scattering spectra of chicken breast tissue." Appl Opt **37**(4): 798-804.

Masters, J. R. (2002). "HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly." Nat Rev Cancer **2**(4): 315-319.

Meaney, P. M., K. D. Paulsen, A. Hartov and R. K. Crane (1996). "Microwave imaging for tissue assessment: Initial evaluation in multitarget tissue-equivalent phantoms." Ieee Transactions on Biomedical Engineering **43**(9): 878-890.

Meulenberg, R. W., J. R. Lee, A. Wolcott, J. Z. Zhang, L. J. Terminello and T. Van Buuren (2009). "Determination of the exciton binding energy in CdSe quantum dots." ACS nano **3**(2): 325-330.

Michalet, X., F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir and S. Weiss (2005). "Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics." Science **307**(5709): 538-544.

Mohamed, M. B., K. Z. Ismail, S. Link and M. A. El-Sayed (1998). "Thermal Reshaping of Gold Nanorods in Micelles." The Journal of Physical Chemistry B **102**(47): 9370-9374.

Mooradian, A. (1969). "Photoluminescence of Metals." Physical Review Letters **22**(5): 185-187.

Mortensen, L. J., G. Oberdörster, A. P. Pentland and L. A. DeLouise (2008). "In Vivo Skin Penetration of Quantum Dot Nanoparticles in the Murine Model: The Effect of UVR." Nano Letters **8**(9): 2779-2787.

Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays." Journal of Immunological Methods **65**(1-2): 55-63.

Müller, H. (1996). "Optical Properties of Metal Clusters." Zeitschrift für Physikalische Chemie **194**(Part_2): 278-279.

Nikolic, M. S., M. Krack, V. Aleksandrovic, A. Kornowski, S. Förster and H. Weller (2006). "Tailor-Made Ligands for Biocompatible Nanoparticles." Angewandte Chemie International Edition **45**(39): 6577-6580.

Norris, D. J. and M. G. Bawendi (1996). "Measurement and assignment of the size-dependent optical spectrum in CdSe quantum dots." Physical Review B **53**(24): 16338-16346.

Novotny, L. and B. Hecht (2012). Principles of nano-optics, Cambridge university press.

O'Grady, N. P., P. S. Barie, J. G. Bartlett, T. Bleck, G. Garvey, J. Jacobi, P. Linden, D. G. Maki, M. Nam and W. Pasculle (1998). "Practice guidelines for evaluating new fever in critically ill adult patients." Clinical infectious diseases **26**(5): 1042-1059.

Olkhovets, A., R. C. Hsu, A. Lipovskii and F. W. Wise (1998). "Size-dependent temperature variation of the energy gap in lead-salt quantum dots." Physical Review Letters **81**(16): 3539-3542.

Papavassiliou, G. C. (1979). "Optical properties of small inorganic and organic metal particles." Progress in Solid State Chemistry **12**(3-4): 185-271.

Resch-Genger, U., M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke and T. Nann (2008). "Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels." Nature Methods **5**(9): 763-775.

Robinson, J. T., S. M. Tabakman, Y. Liang, H. Wang, H. S. Casalongue, D. Vinh and H. Dai (2011). "Ultrasmall reduced graphene oxide with high near-infrared absorbance for photothermal therapy." J Am Chem Soc **133**(17): 6825-6831.

Robinson, J. T., K. Welsher, S. M. Tabakman, S. P. Sherlock, H. L. Wang, R. Luong and H. J. Dai (2010). "High Performance In Vivo Near-IR ($> 1 \mu\text{m}$) Imaging and Photothermal Cancer Therapy with Carbon Nanotubes." Nano Research **3**(11): 779-793.

Rodríguez-Oliveros, R. and J. A. Sánchez-Gil (2012). "Gold nanostars as thermoplasmonic nanoparticles for optical heating." Optics Express **20**(1): 621-626.

Roti Roti, J. L. (2008). "Cellular responses to hyperthermia (40-46 degrees C): cell killing and molecular events." Int J Hyperthermia **24**(1): 3-15.

Sargent, E. H. (2005). "Infrared quantum dots." Advanced Materials **17**(5): 515-522.

Scifinder. (2015, 21/01/2015).

Schlegel, G., J. Bohnenberger, I. Potapova and A. Mews (2002). "Fluorescence decay time of single semiconductor nanocrystals." Physical Review Letters **88**(13).

Selhuber-Unkel, C., I. Zins, O. Schubert, C. Sonnichsen and L. B. Oddershede (2008). "Quantitative optical trapping of single gold nanorods." Nano Lett **8**(9): 2998-3003.

Shi, X., S. Wang, H. Sun and J. R. Baker (2007). "Improved biocompatibility of surface functionalized dendrimer-entrapped gold nanoparticles." Soft Matter **3**(1): 71-74.

Shuhendler, A. J., P. Prasad, H.-K. C. Chan, C. R. Gordijo, B. Soroushian, M. Kolios, K. Yu, P. J. O'Brien, A. M. Rauth and X. Y. Wu (2011). "Hybrid Quantum Dot-Fatty Ester Stealth Nanoparticles: Toward Clinically Relevant in Vivo Optical Imaging of Deep Tissue." Acs Nano **5**(3): 1958-1966.

Sinha, N. and J. T. W. Yeow (2005). "Carbon nanotubes for biomedical applications." NanoBioscience, IEEE Transactions on **4**(2): 180-195.

Smith, A. M., S. Dave, S. Nie, L. True and X. Gao (2006). "Multicolor quantum dots for molecular diagnostics of cancer." Expert Review of Molecular Diagnostics **6**(2): 231-244.

Smith, A. M., M. C. Mancini and S. Nie (2009). "Second Window for *in Vivo* Imaging." Nat. Nanotechnol. **4**: 710-711.

Solé, J. G., L. E. Bausá and D. Jaque (2005). Front Matter. An Introduction to the Optical Spectroscopy of Inorganic Solids, John Wiley & Sons, Ltd: i-xx.

Song, L., E. J. Hennink, I. T. Young and H. J. Tanke (1995). "Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy." Biophys J **68**(6): 2588-2600.

Sun, X., Z. Liu, K. Welsher, J. T. Robinson, A. Goodwin, S. Zaric and H. Dai (2008). "Nano-Graphene Oxide for Cellular Imaging and Drug Delivery." Nano Res **1**(3): 203-212.

Teeguarden, J. G., P. M. Hinderliter, G. Orr, B. D. Thrall and J. G. Pounds (2007). "Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments." Toxicological Sciences **95**(2): 300-312.

Tsai, M. F., S. H. Chang, F. Y. Cheng, V. Shanmugam, Y. S. Cheng, C. H. Su and C. S. Yeh (2013). "Au nanorod design as light-absorber in the first and second biological near-infrared windows for in vivo photothermal therapy." ACS Nano **7**(6): 5330-5342.

Van der Zee, J. (2002). "Heating the patient: a promising approach?" Annals of oncology **13**(8): 1173-1184.

van Driel, A. F., G. Allan, C. Delerue, P. Lodahl, W. L. Vos and D. Vanmaekelbergh (2005). "Frequency-dependent spontaneous emission rate from CdSe and CdTe nanocrystals: influence of dark states." Phys Rev Lett **95**(23): 236804.

Vorotnikova, E., R. Ivkov, A. Foreman, M. Tries and S. J. Braunhut (2006). "The magnitude and time-dependence of the apoptotic response of normal and malignant cells subjected to ionizing radiation versus hyperthermia." Int J Radiat Biol **82**(8): 549-559.

Walker, G. W., V. C. Sundar, C. M. Rudzinski, A. W. Wun, M. G. Bawendi and D. G. Nocera (2003). "Quantum-dot optical temperature probes." Applied Physics Letters **83**(17): 3555.

Wang, H., T. B. Huff, D. A. Zweifel, W. He, P. S. Low, A. Wei and J. X. Cheng (2005). "In vitro and in vivo two-photon luminescence imaging of single gold nanorods." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(44): 15752-15756.

Wang, Y., K. C. L. Black, H. Luehmann, W. Li, Y. Zhang, X. Cai, D. Wan, S.-Y. Liu, M. Li, P. Kim, Z.-Y. Li, L. V. Wang, Y. Liu and Y. Xia (2013). "Comparison Study of Gold Nanohexapods, Nanorods, and Nanocages for Photothermal Cancer Treatment." Acs Nano **7**(3): 2068-2077.

Welsher, K., S. P. Sherlock and H. Dai (2011). "Deep-tissue anatomical imaging of mice using carbon nanotube fluorophores in the second near-infrared window." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(22): 8943-8948.

Wong, B. T. and P. M. Mengüç (2008). Thermal Transport for Applications in Micro/Nanomachining, Springer.

Wood, D. J., F. E. Hruska and W. Saenger (1977). "H-1 NMR-STUDY OF INCLUSION OF AROMATIC-MOLECULES IN ALPHA-CYCLODEXTRIN." Journal of the American Chemical Society **99**(6): 1735-1740.

Wuister, S. F., I. Swart, F. van Driel, S. G. Hickey and C. de Mello Donegá (2003). "Highly Luminescent Water-Soluble CdTe Quantum Dots." Nano Letters **3**(4): 503-507.

Wunderlich, C. A. (1871). On the temperature in diseases, The New Sydenham Society.

Wust, P., B. Hildebrandt, G. Sreenivasa, B. Rau, J. Gellermann, H. Riess, R. Felix and P. M. Schlag (2002). "Hyperthermia in combined treatment of cancer." Lancet Oncol **3**(8): 487-497.

Yang, J. M., H. Yang and L. Lin (2011). "Quantum dot nano thermometers reveal heterogeneous local thermogenesis in living cells." ACS Nano **5**(6): 5067-5071.

Yu, W. W., E. Chang, R. Drezek and V. L. Colvin (2006). "Water-soluble quantum dots for biomedical applications." Biochem Biophys Res Commun **348**(3): 781-786.

Yu, W. W., L. Qu, W. Guo and X. Peng (2003). "Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals." Chemistry of Materials **15**(14): 2854-2860.

Yuan, H., C. G. Khoury, C. M. Wilson, G. A. Grant, A. J. Bennett and T. Vo-Dinh (2012). "In vivo particle tracking and photothermal ablation using plasmon-resonant gold nanostars." Nanomedicine **8**(8): 1355-1363.

Zhang, Y., C. Gu, A. M. Schwartzberg, S. Chen and J. Z. Zhang (2006). "Optical trapping and light-induced agglomeration of gold nanoparticle aggregates." Physical Review B **73**(16): 165405.

Zhao, H. and H. Kalt (2003). "Energy-dependent Huang-Rhys factor of free excitons." Physical Review B **68**(12): 125309.

Zhao, Y., C. Riemersma, F. Pietra, R. Koole, C. de Mello Donegá and A. Meijerink (2012). "High-Temperature Luminescence Quenching of Colloidal Quantum Dots." ACS Nano **6**(10): 9058-9067.

Zhou, D., M. Lin, X. Liu, J. Li, Z. Chen, D. Yao, H. Sun, H. Zhang and B. Yang (2013). "Conducting the Temperature-Dependent Conformational Change of Macrocyclic Compounds to the Lattice Dilation of Quantum Dots for Achieving an Ultrasensitive Nanothermometer." ACS Nano **7**(3): 2273-2283.

Zhou, D. and H. Zhang (2013). "Critical Growth Temperature of Aqueous CdTe Quantum Dots is Non-negligible for Their Application as Nanothermometers." Small **9**(19): 3195-3197.

Zhou, F., D. Xing, Z. Ou, B. Wu, D. E. Resasco and W. R. Chen (2009). "Cancer photothermal therapy in the near-infrared region by using single-walled carbon nanotubes." J Biomed Opt **14**(2): 021009.

Zijlstra, P., J. W. Chon and M. Gu (2009). "Five-dimensional optical recording mediated by surface plasmons in gold nanorods." Nature **459**(7245): 410-413.